

Aus der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie  
der Philipps-Universität Marburg  
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med Peter Griss)  
(Direktor: Prof. Dr. med. Peter Griss)

# **Zytokinprofil einer humanen Knochenmarkzellkultur nach Exposition mit Tivanium-Abriebpartikeln**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

Dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt

*von*

**Stefan Endres**

aus Langgöns  
Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am 13.06.2002  
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof. Dr. Arnold

Referent: PD Dr. med. Dr. rer. physiol. Wilke

Koreferent: Prof. Dr. Gemsa

*So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig.*

*Man muss sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das Mögliche  
getan hat.*

*Johann Wolfgang von Goethe, „Italienreise“ (1787)*

***Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet!***

***Zytokinprofil einer humanen  
Knochenmarkzellkultur nach Exposition  
mit Tivanium-Abriebpartikeln***

***Von***

***Stefan Endres***

# ***Inhaltsverzeichnis***

<b><i>I. Geschichte der Endoprothetik</i></b>	<b><i>9</i></b>
<b><i>II. Probleme der zementfreien Verankerungstechnik bei der Hüft- Totalendoprothese</i></b>	<b><i>11</i></b>
<b><i>III. Einleitung</i></b>	<b><i>14</i></b>
<b><i>3.1 Zellkultur und Tierversuche</i></b>	<b><i>19</i></b>
<b><i>3.1.1 Zellarten</i></b>	<b><i>20</i></b>
<b><i>3.1.3 Hämatopoese im Knochenmark</i></b>	<b><i>23</i></b>
<b><i>3.1.5 Leukopoese im Knochenmark</i></b>	<b><i>25</i></b>
<b><i>3.1.6 Unspezifische Abwehr</i></b>	<b><i>27</i></b>
<b><i>3.1.7 Entzündung und spezifische Reaktion</i></b>	<b><i>28</i></b>
<b><i>3.1.8 Lokale Regulation des Knochenwachstums</i></b>	<b><i>29</i></b>
<b><i>3.2 Zytokine und Wachstumsfaktoren</i></b>	<b><i>30</i></b>
<b><i>3.2.1 Kolonie-stimulierender Faktor (CSF)</i></b>	<b><i>32</i></b>
<b><i>3.2.2 Granulozyten-Makrophagen-Kolonie- stimulierender Faktor (GM-CSF)</i></b>	<b><i>34</i></b>
<b><i>3.2.3 Interleukin-3 (IL-3; Multi-Kolonie-stimulierender Faktor)</i></b>	<b><i>36</i></b>
<b><i>3.2.4 Interleukin-1b (IL-1b)</i></b>	<b><i>38</i></b>
<b><i>3.2.5 Tumornekrosefaktor-a und -b (TNF-a und TNF-b)</i></b>	<b><i>39</i></b>
<b><i>3.2.6 Interleukin-6 (IL-6)</i></b>	<b><i>40</i></b>
<b><i>3.3 Fragestellung</i></b>	<b><i>42</i></b>

<b>IV. Material und Methoden</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Knochenmarkpräparation</b>	<b>43</b>
<b>4.1.1 Zellkultur-Medium</b>	<b>48</b>
<b>4.1.2 Kulturbedingungen</b>	<b>49</b>
<b>4.2 Materialauswahl</b>	<b>50</b>
<b>4.2.1 Charakterisierung von Titan<sub>6</sub>-Aluminium<sub>4</sub>-Vanadium</b>	<b>51</b>
<b>4.3 Rasterelektronenmikroskopie</b>	<b>53</b>
<b>4.4 Zellzahlbestimmung</b>	<b>54</b>
<b>4.5 „Fluorescence activating cell sorter“ (FACS)</b>	<b>55</b>
<b>4.5.1 Zelloberflächenantigene (CD-Antigene)</b>	<b>58</b>
<b>4.6 Statistik (Students-t-Test)</b>	<b>60</b>
<b>4.7 Versuchsmaterialien</b>	<b>64</b>

<b>V. Ergebnisse</b>	<b>66</b>
<b>5.1 Zellkultur ohne Tivaniumabriebpartikel (Kontrolle)</b>	<b>66</b>
5.1.1 Kontrolle von Zelloberflächenantigenen ( Zelldifferenzierung)	67
5.1.2 Zytokinprofil bei verschiedenen Zellzahlen ohne Partikelzusatz	68
5.1.3 Zytokinprofil bei 305.000 Zellen pro cm <sup>2</sup> ohne Partikelzusatz	73
5.1.4 Einfluß der Wachstumsfaktoren auf die Freisetzung von Mediatoren	78
<b>5.2 Humane Knochenmarkzellkultur versetzt mit Tivanium- Abriebpartikeln</b>	<b>82</b>
5.2.1 Zellzahlentwicklung der humanen Knochenmark- zellkultur unter Tivaniumexposition	82
5.2.2 Zytokinprofil der humanen Knochenmarkzellkultur unter Tivaniumexposition	91
5.2.3 Zelldifferenzierung der humanen Knochenmarkzellkultur am Tag der maximalen Zytokinexpression nach Tivaniumpartikel- stimulation	97

<b>VI. Diskussion</b>	<b>104</b>
<b>6.1 Allgemeine Betrachtung</b>	<b>104</b>
<b>6.2 Zellkulturergebnisse im Vergleich</b>	<b>110</b>
<b>6.3 Vorteile der humanen Knochenmarkzellkultur</b>	<b>115</b>
<b>6.4 Nachteile der humanen Knochenmarkzellkultur</b>	<b>117</b>
<b>6.5 Standardisierbarkeit</b>	<b>118</b>
<b>6.6 Ausblick</b>	<b>119</b>
<b>VII. Zusammenfassung</b>	<b>121</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>125</b>
<b>Anhang</b>	<b>127</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>155</b>



## *I. Geschichte der Endoprothetik*

Die ersten Operationen zur Behandlung von Gelenkfehlbildungen und Gelenkfehlstellungen wurden erstmalig im frühen 19. Jahrhundert durchgeführt. John Rhea Barton führte 1826 zum ersten Mal eine Hüftgelenkosteotomie zur Behandlung einer posttraumatischen Hüftgelenkankylose durch. [Barton JR 1827]

Durch dieses Operationsverfahren inspiriert, versuchten sich viele Institute an der Weiterentwicklung der Operationstechnik nach Barton.

Infolgedessen entstand die Technik der subkutanen Osteotomie, die dann erstmals von Langenbeck 1852 durchgeführt wurde.

1880 wurde von Wolff eine Arthrolyse als neue Methode der Gelenkmobilisation vorgestellt. 1902 wurde dieses Modell von Kocher modifiziert, der eine zusätzliche Luxation der Gelenkpartner favorisierte.

Zur gleichen Zeit wurde bereits an Interpositionsarthroplastiken mit anorganischen Interponaten gearbeitet. Als anorganische Interponate dienten Holz, Magnesium, Silber, Zink, Elfenbein, Goldfolie, Zelluloid und Guttapercha. (Baer WS 1918, Hoffa 1906, Mac Ausland 1924)

In einer weiteren Modifizierung entwarf Smith-Petersen 1917 / 1923 die sogenannte „mould arthroplasty“. [Smith-Petersen MN 1948] Dieses Interponat bestand zunächst aus gewöhnlichem Glas, später aus Pyrexglas, Viscaloid und Bakelit. 1938 wurde zum ersten Mal Vitallium verwendet. [Smith-Petersen MN 1939] Smith-Petersen und Ausfranc konnten später zeigen, dass zwischen Interponat und Knochengewebe ein fibrocartilaginärer Umbau stattfand. Dabei kam es zu trophischen Störungen, die mit nachfolgenden Nekrosen einhergingen. [Smith-Petersen MN 1948,1938; Ausfranc OE 1937]

Insbesondere Murphy beeinflusste die Entwicklung von Operationstechnik und Einsatz von Instrumenten zur Interpositionsarthroplastik an kleinen und großen Gelenken.

In Deutschland setzte Lexer schließlich unterschiedliche autogene, allogene (Muskelfaszie, Fettlappen, Muskel) und xenogene (Schweinsblase) Transplantate sowie auch anorganische Interpositionsimplantate (Magnesium, Silber, Goldfolie) als Knorpelersatz ein. [Lexer E 1924]

Bei den Resektionsarthroplastiken unterscheidet man zwei verschiedene Formen. Bei dem einen Verfahren wollte man durch Resektion eines oder aller Gelenkteile durch das sich bildende Narbengewebe einen funktionellen Gelenkersatz erreichen. [Girdlestone GR 1943] Beim zweiten Verfahren wollte man den oder die resezierten Gelenkpartner durch massive allogene Gelenktransplantate ersetzen. [Lexer E 1931]

Diese Verfahren zeigten so gute Ergebnisse, dass sie auch heute wieder in der onkologischen Orthopädie und bei Revisionsarthroplastiken an Bedeutung gewonnen haben. [Gross AE et al 1975,1985]

Die eigentliche Ersatzarthroplastik wurde zum ersten Mal wahrscheinlich mit der von Gluck 1890 entwickelten Knie-Totalendoprothese aus Elfenbein eingesetzt. [Gluck T 1890] 1940 wurde von Moore und Belham erstmals das proximale Femurende durch eine spezielle Femurankerprothese aus Vitallium intramedullär ersetzt. [Moore AT et al 1943] Darauf basierend wurden die verschiedensten Weiterentwicklungen im Laufe der Jahre vorgestellt. [Moore AT 1952, 1957]

1946 wurde von Robert und Jean-Judet eine weitere Modifizierung dieser Technik vorgestellt, die eine Stiftendoprothese aus Polymethylmethacrylat (PMMA) verwendeten.

Alternativ wurde aufgrund der nur mittelfristig andauernden guten Resultate mit Kunststoffstiftprothesen, die wegen ihrer geringen Steifigkeit und starken Sprödigkeit als Werkstoffe keine langfristige Lösung darstellten, an Verankerungsprothesen aus Vitallium gearbeitet. [Moore AT 1952, Charnley J 1960]

1960 führte das neu eingeführte autopolymerisierende Methylmethacrylat zur Revolution in der Prothesenverankerungstechnik. [Charnley J 1960] Bis heute wird Polymethylmethacrylat zum Teil in modifizierten Formen der Applikation und Zusammensetzung noch eingesetzt.

## ***II. Probleme der zementfreien Verankerungstechnik bei der Hüft- Totalendoprothese***

Das Ziel der zementfreien Totalendoprothesen-Operation stellt die Integration von Hüftgelenkinterponaten in das knöcherne Implantatlager mit einer angemessenen Fixation der Prothese dar.

Um ein optimales Ergebnis erzielen zu können wurde versucht, sowohl die biomechanischen als auch die werkstofftechnischen Einflussgrößen zu optimieren.

Unter die sogenannten werkstofftechnischen Einflussgrößen fallen die Biokompatibilitätseigenschaften des Implantats in Form der physikochemischen Eigenschaften sowie das biologische Verhalten im Organismus.

Zu den biomechanischen Eigenschaften zählt die Prothesensteifigkeit, die definiert ist als Produkt aus dem E-Modul und dem Flächenträgheitsmoment.

Für Biomaterialien, die ihr Einsatzgebiet als Gleitpartner in der Alloarthroplastik haben, ist vor allem die Bestimmung der Verschleißfestigkeit von Bedeutung. In verschiedenen Testverfahren lässt sich das Reibungsverhalten von Biomaterialien untereinander analysieren. (Abriebpartikelbildung)

Der für den Verschleiß charakteristische Reibungskoeffizient hängt insbesondere von der Wahl der verwendeten Biomaterialien und deren Oberflächenbeschaffenheit ab. Bedingt durch die Reibung der beiden Gleitpartner können beide oder nur eine der Reibungsflächen beschädigt werden. Die Oberflächen rauhen ab und es kommt zum Materialverlust mit Bildung von Abriebpartikeln, die dann im Organismus verschiedene lokale und auch systemische Reaktionen hervorrufen können. Dies führt zu einer entsprechenden Fremdkörperreaktion im Organismus. Des weiteren kann durch den Verschleiß der Materialoberfläche ein Korrosionsvorgang initiiert werden.

Insgesamt können die Folgeerscheinungen einer unzureichenden Prothesenmaterialverschleißfestigkeit die dauerhafte Implantatverankerungsfestigkeit negativ beeinflussen. [Willert HG et al 1980a,b]

Im biologischen Milieu können Oxidationsvorgänge eine Grundlage für Korrosionsabläufe sein. Aufgrund dessen versucht man, Implantatwerkstoffe an der Oberfläche zu passivieren, indem man eine Oxidationsschicht aufträgt. Die Aufgabe

von Studien zur Analyse von Biomaterialeigenschaften besteht in der Bestimmung der „in vivo“ und „in vitro“ Verträglichkeit und Beständigkeit.

Augenmerk sollte insbesondere im Hinblick auf die Antigenität (Immunantwort), der eventuellen Kanzerogenität und Toxizität gelegt werden. Die typische Immunantwort einer auf Metallhaptene sensibilisierten Person ist eine zellvermittelte Immunreaktion vom Typ IV mit verzögerten Wirkungseintritt nach 48h – 72h. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie auf einen genügend langen Beobachtungszeitraum Wert gelegt.

Die Kanzerogenität einiger Biomaterialien wurde bereits nachgewiesen. [Black J et al 1987, Heath JC et al 1971]

Diese Erkenntnisse wurden von epidemiologischen Studien bestätigt. [Gard et al 1990]

Im Hinblick auf die Toxizität gibt es erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Biomaterialien. Das in dieser Studie verwendete Titan-Aluminium-Vanadium hat für seine drei Bestandteile verschiedene Toxizitätseigenschaften.

Titan stellt nach Whitehead hinsichtlich seiner Toxizität kein Risiko dar. [Whitehead et al 1984]. Vanadium ist dagegen nur in relativ hohen Dosen für den Menschen toxisch. [Bowen RL 1979]. Aluminium galt lange Zeit als ungiftig. Inzwischen wurden aber verschiedene Krankheitsbilder mit erhöhter Aluminiumbelastung in Zusammenhang gebracht und diskutiert (Lungenfibrose, progressive Enzephalopathie). [Valentin B 1961]

Die in Deutschland und anderen europäischen Ländern verbreitete Einteilung der knöchernen Gewebereaktion auf Biomaterialien lässt sich auf Osborn zurückführen, der biotolerante Werkstoffe von bioinerten und bioaktiven Werkstoffen unterscheidet. [Osborn JF 1979] Analog dazu wurde die Reaktion des Implantatlagers als Distanzosteogenese, Kontaktosteogenese und Verbundosteogenese beschrieben.

Die hier dargestellten Sachverhalte beinhalten Grundvoraussetzungen für das Gelingen einer zementfreien Implantatverankerung. Dazu zählen neben der Biologie der Osteogenese die Anwendung eines Materials von hoher Biokompatibilität, welches möglichst frei von Abrieb ist sowie eine Optimierung der lokalen Grenzflächenvoraussetzungen.

In dieser Studie werden Abriebpartikel von Titan-Aluminium-Vanadium einer humanen Knochenmarkzellkultur, welche dem Wirkort „in situ“ entspricht, zugesetzt und diese hinsichtlich ihrer Antigenität und Toxizität (? Interleukin-6, Interleukin-1 $\beta$ , Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und LDH) untersucht. Zusätzlich wird eine Zelldifferenzierung zum Zeitpunkt der maximalen Zytokinfreisetzung durchgeführt.

### ***III. Einleitung***

Werden die operativen Maßnahmen der Orthopädie in der heutigen Zeit genauer betrachtet, wird deutlich, dass der größte Anteil an Operationen in das Gebiet der Endoprothetik fällt. Das Hauptproblem im Bereich der Endoprothetik liegt nicht alleine bei der primären Prothesenversorgung. Vielmehr stellt die frühzeitige Lockerung (aseptisch) der Prothese die größte Herausforderung dar.

Die Lebensdauer von Endoprothesen und die damit verbundene Zahl der Revisions-Operationen basiert auf dem artikulären Abrieb und der daraus resultierenden frühzeitigen aseptischen Lockerung von Endoprothesen.

Mit der steigenden durchschnittlichen Lebenserwartung und dem gleichzeitig sinkenden durchschnittlichen Lebensalter, in dem sich Patienten einer Endoprothesen-Operation unterziehen müssen wird deutlich, dass in nächster Zukunft ein Hauptaugenmerk auf dieses Gebiet der Endoprothetik gelegt werden sollte.

Aufgrund der nach neuesten Statistiken zu erwartenden steigenden Patientenzahlen und dabei gleichzeitig sinkenden finanziellen Ressourcen ist eine Lösung dieses Problem notwendig.

Als Beispiel kann man stellvertretend die Implantation der Hüft-Totalendoprothesen (Hüft-TEP) anführen. Der größte Teil der zur Zeit implantierten zementfreien künstlichen Hüftgelenken bestehen aus einem Titanschaft, Metall- oder Keramik-Kopf, welcher mit einer UHMWPE-Gelenkpfanne (ultra-high molecular weight polyethylene) umgeben von einem Titangitter artikuliert.

Da kein Endoprothesen-Material frei von artikulärem Abrieb ist, kommt es durch das Aufeinanderreiben der beiden korrespondierenden künstlichen Gelenkflächen zum Phänomen der Abrieb-Partikel-Bildung. Doch nicht nur an der artikulierenden Gelenkfläche kommt es zur Abriebpartikelbildung. Dieses Phänomen kann auch überall sonst an der Endoprothese auftreten. Von dem jeweils verwendeten Endoprothesen-Material hängt ab welche Partikel entstehen und von welcher Größe diese Partikel sind. Bei einer Verschleißrate von etwa 0,1mm pro Jahr entstehen in der Regel überwiegend Partikel mit einer Größe von  $<10\mu\text{m}$  im Bezug auf Polyethylen und von  $<1\mu\text{m}$  in Bezug auf Metalle. [Schmalzried TP et al 1997, Agins HJ et al 1988]

Im periartikulären Gewebe von, aseptisch gelockerten Endoprothesen wurden Partikelkonzentrationen von  $1 \times 10^9$  –  $100 \times 10^9$  gefunden.

Diese Partikel bleiben nicht nur am Ort ihrer Entstehung, sondern werden über die Lymphbahnen abtransportiert. Später lassen sie sich im gesamten Retikuloendothelialen-System, sowie Haut, Haare, Urin, Nieren und Blut nachweisen.

Nach Phagozytose der Abriebpartikel durch Makrophagen / Monozyten führen sie zu deren Aktivierung mit nachfolgender Zytokinsekretion. Zusätzlich kommt es zu einer Partikel-induzierten Aktivierung von Zellen des Immunsystems (B- und T-Lymphozyten). [Gill-Alborova 1992, Vernon-Roberts et al 1977, Willert HG et Semlitsch M 1977]

Berichte von makroskopisch schwarzgefärbten periartikulären Gewebe bei frühzeitig, aseptisch gelockerten Hüft- und Knie-Endoprothesen ließen den Verdacht aufkommen, dass diese Metallpartikel für die Lockerung verantwortlich sein können. [Agins HJ et al 1988]

Frühere „in vivo“ und „in vitro“ Studien zeigten, dass Makrophagen / Monozyten, welche Abriebpartikel phagozytiert hatten, verschiedene Mediatoren produzierten, die eine Änderung der Aktivität von anderen Zellen, einschließlich knochenabbauender Zellen bedingen können. [Haynes DR et al 1993, Jiranek W et al 1993] Diese Mediatoren wurden „in vitro“ als Antwort auf die Exposition mit Abriebpartikel von Zellen freigesetzt. [Horowitz SM et al 1991, Murray PM et al 1998]

Interleukin-6, Interleukin-1 $\beta$ , TNF- und PGE2 sind bekannt dafür, dass sie eine große Rolle im Knochenstoffwechsel, besonders im Hinblick auf den Knochenabbau besitzen. [Ishimi Y et al 1990, Vaes G 1988] Diese Zytokine sind im wesentlichen für einen exzessiven periprothetischen Knochensubstanzverlust verantwortlich, was schließlich zur frühzeitigen, aseptischen Lockerung der Prothese führt.

Die Entwicklung im Bereich der Endoprothetik führt dazu, dass in den nächsten Jahren die Anzahl an jüngeren Patienten, die sich einer Operation unterziehen müssen, steigt. (USA 10% der Patienten sind jünger als 40 Jahre) Daraus lässt sich ableiten, dass diese Patienten länger mit ihrer Endoprothese leben müssen. Da Metall-Metall-Gleitpaarungen vom Abriebverhalten günstiger sind als Polymer-Keramik-Gleitpaarungen, werden Metall-Metall-Gleitpaarungen vermehrt eingesetzt. Nachteilig

könnte sich allerdings die Produktion von Metallabriebpartikeln zeigen. [Willert HG et al 1978, Streicher RM et al 1990]

Die Präsenz von Metall-Abriebpartikeln und deren möglicher Einfluss auf den Knochenabbau wird bereits seit der Entwicklung und dem Einsatz von zementierten und unzementierten Metall-Metall-Gleitpaarungen und Metall-Polyethylen-Gleitpaarungen diskutiert.

Das Problem der Abriebpartikelbildung mit dem fakultativen Problem der sogenannten „particle disease“ stellt für die nähere Zukunft ein großes Problem in der Endoprothetik dar. Zur Zeit werden in Deutschland etwa 500.000 primäre Hüft- bzw. Knie-Endoprothesen pro Jahr implantiert. Da die Lebensdauer der Prothesen stark mit der Abriebpartikelbildung in Zusammenhang steht bedeutet dies, dass heutzutage auch aus medizinökonomischer Sicht eine Lösung dieses Problems notwendig wird.

Aufgrund dieser Tatsache wurden in dieser Studie Experimente durchgeführt, bei denen eine Beeinflussung der humanen Knochenmarkzellkultur durch Metallabriebpartikel erfolgte und eine mögliche Änderung der Zytokinfreisetzung untersucht wurde.

Titan-Aluminium-Vanadium (Tivanium) ist ein häufig zum Einsatz kommendes Prothesenmaterial und wurde deshalb in dieser Studie auf seine Biokompatibilität getestet.

Der humanen Knochenmarkzellkultur (eingeführt und standardisiert im Labor für experimentelle Orthopädie Philipps-Universität Marburg) kommt dabei eine besondere Bedeutung zu.

Im Vergleich zu anderen Zellkulturstudien wurde in dieser Studie mit einem neuartigen Ansatz gearbeitet. Diese Studie verwendet zur Erforschung der „particle disease“ eine humane Knochenmarkzellkultur. Der entscheidende Vorteil dieses Zellkulturmodells ist es, dass die anatomische Struktur mit der ein Endoprothesen-Material „in situ“ in Kontakt kommt das humane Knochenmark ist. Außerdem ist das Knochenmark der Ort, von dem eine Immunantwort auf lokal und systemisch wirkende Substanzen ausgeht.

Andere Studiengruppen haben das Problem der sogenannten „particle disease“ mit nicht relevanten Zellkulturmodellen versucht zu erforschen.



Diese bisherigen Studien zeigten für das als orthopädisches Biomaterial in der Endoprothetik eingesetzte Tivanium ähnliche, aber zum Teil auch stark differente Ergebnisse.

1997 fanden Haynes [Haynes DR et al 1997] und Mitarbeiter anhand einer über 48 Stunden mit Tivanium versetzten humanen MNP-Zellkultur (Mononukleäre Phagozyten) einen signifikanten Anstieg der Zytokine Interleukin-6, Interleukin-1 $\beta$  sowie TNF- $\alpha$  bei den Partikelkonzentrationen von  $4 \times 10^7$  und  $1 \times 10^7$  Partikel pro ml Medium.

In einer weiteren Studie wurde 1998 von Haynes und Mitarbeitern [Haynes et al DR 1998] bei einer über 72 Stunden mit Tivanium versetzten humanen Makrophagen-Zellkultur ebenfalls ein Anstieg der Zytokine Interleukin-6, Interleukin-1 $\beta$  sowie TNF- $\alpha$  nachgewiesen. Hierbei kam es aber zu einem sehr starken Anstieg der Interleukin-6 Sekretion. Im Vergleich zur Studie von 1997 [Haynes DR et al 1997] war dieser Interleukin-6 Anstieg sehr viel stärker.

1997 zeigten Rogers und Mitarbeiter [Rogers SD et al 1997] bei einer mit Tivanium versetzten humanen Monozyten-Zellkultur einen entsprechenden konzentrationsabhängigen Anstieg der Zytokine Interleukin-6, Interleukin-1 $\beta$  sowie TNF- $\alpha$ .

Zusammenfassend zeigen diese Studien von nicht relevanten Zellkulturmodellen nach Tivanium-Partikelexpositionen keine einheitlichen Resultate.

Dies liegt womöglich an den jeweils verwendeten Zellkulturmodellen, bei denen das eigentliche Effektorgewebe von Prothesen und deren Abriebpartikeln, das Knochenmark nicht berücksichtigt wird.

Rogers und Mitarbeiter [Rogers SD et al 1997] benutzten ausschließlich humane Monozyten. Haynes und Mitarbeiter [Haynes DR et al 1997, 1998] verwendeten humane, mononukleäre Phagozyten sowie humane Makrophagen. Der Ort der Endoprothese und die daraus entstehenden Teilchen befinden sich jedoch zentral im humanen Knochenmark, dem Effektorgewebe.

Hinzu kommt noch der mit 48 beziehungsweise 72 Stunden relativ kurze Untersuchungszeitraum der Zellkultur.

Aus diesem Grunde wurde eine in unserem Labor etablierte und standardisierte humane Knochenmarkzellkultur [Wilke et al 1991, 1992, 1993, 1995, 1999,2000] mit Tivanium-Partikeln versetzt und die Zytokinexpression von TNF- $\alpha$ , Interleukin 6 und Interleukin 1- $\beta$  gemessen.

Zur Beurteilung der Zelltoxizität von Tivanium wurde als Marker zusätzlich die Aktivität von LDH photometrisch bestimmt. Um einen eventuellen Effekt der Wachstumsfaktoren auf die erhöhte Freisetzung der Mediatoren auszuschließen wurde mit der sogenannten „matched pairs“-Technik gearbeitet. Hierbei wurde bei jeder humanen Knochenmarkzellkultur, die mit Wachstumsfaktoren versetzt wurde eine identische Kultur angelegt. Mit dieser sog. „matched pairs“ Technik kann man nachweisen, ob die Stimulationseffekte auch ohne den Zusatz von Wachstumsfaktoren eintreten und nicht nur eine Folge des Zellprimings sind.

Die lokale Reaktion des humanen Knochenmarks auf Titan-Aluminium-Vanadium-Partikel kann mit einer Stimulation einhergehen, die über mehrere Schritte zur Zytokinfreisetzung führt und schließlich eine Resorption von Knochensubstanz bewirkt. Gleichzeitig kann es zu einer Differenzierungsänderung der Zellpopulation des humanen Knochenmarks kommen. Um diese Veränderungen der Zelldifferenzierung erfassen zu können, wurde eine FACS-Analyse („fluorescence activating cell sorter“) der humanen Knochenmarkzellkultur-Population am Tag der maximalen Zytokinfreisetzung durchgeführt.

Ein Vorteil bei der Verwendung des Modells der humanen Knochenmarkzellkultur ist die Möglichkeit, die Reaktion auf Tivanium-Partikel umfassend zu analysieren. Weiterhin können Vergleiche zu anderen bereits beendeten Zellkulturstudien und Tierexperimenten gezogen werden und man kommt der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus einen Schritt näher.

### ***3.1 Zellkultur und Tierversuche***

Ein wesentliches Problem in der Biomaterialien-Testung besteht darin, schädigende Wirkungen einer Substanz schon im Vorfeld, das heißt vor dem Einsatz im oder am Menschen, auszuschließen. Die ersten Versuche zur Biokompatibilitätsprüfung im Tierversuch wurden bereits in den 30er Jahren durchgeführt [Dixon und Rickert, 1933]. Bis heute werden von verschiedenen Arbeitsgruppen Biomaterialien in unterschiedlichen Tierversuchsmodellen getestet. Selbst in der heutigen Zeit sind Tierversuche zur Biokompatibilitätsprüfung ein noch unverzichtbares Mittel [Hayashi et al 1989, Wilke et al 1991, 1992]. Allerdings ist es schwierig eine Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen. Grundsätzlich steht daher immer die Frage im Raum, ob die Resultate auf den Menschen übertragbar sind oder nicht. Aus diesem Grund wurde versucht ein Modell zu entwickeln, welche der Situation im Menschen am nächsten kommt.

Das in dieser Studie verwendete Zellkultur-Modell basiert auf einem von Dexter und Mitarbeiter 1976 entwickeltem Verfahren zur Langzeitkultivierung von Mäuseknochenmark. Dieses Verfahren wurde 1980 im Hinblick auf humanes Knochenmark weiterentwickelt [Hocking WG et al 1980, Gartner S et al 1980] und 1991 von Kalla und Mitarbeitern [Kalla et al 1991] modifiziert. Die Arbeitsgruppe Kalla und Mitarbeiter 1991 [Kalla et al 1991] setzte zu diesem Zeitpunkt erstmals die inzwischen entdeckten hämopoetischen Wachstumsfaktoren Interleukin-3 (IL-3) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktor (GM-CSF) hinzu.

Während die oben erwähnten Arbeiten primär zur Erforschung der Hämatopoese entwickelt wurden, stellte die Arbeitsgruppe von Wilke und Mitarbeiter 1991 [Wilke et al 1991] ein gleichartiges „in vitro“ Zellkultur-Modell vor. Dieses Modell verwendete humanes Knochenmark, das steril im Rahmen einer Hüft-Total-Endoprothesen-Operation (Hüft-TEP) gewonnen wurde und zur Beurteilung von Biokompatibilität bei Biomaterialien dienen sollte.

Die vorliegende Studie verwendet dieses weiterentwickelte Zellkulturmodell zur Analyse des Zytokinprofil, LDH-Bestimmung sowie der Zelldifferenzierung der humanen Knochenmarkzellkultur unter Exposition von Titan-Aluminium-Vanadium-Partikeln.

### 3.1.1 Zellarten

Für die Zuverlässigkeit der Kulturergebnisse ist neben der Auswahl der Zellart auch die Auswahl der Kulturmethode von entscheidender Bedeutung.

Es werden Zellen in der Primärkultur von permanenten Zellen unterschieden.

1. Eine Primärkultur stammt von einer Zellart ab, welche sich nach Entnahme aus dem Herkunftsort zum ersten Mal in Kultur befindet. Nach einer primären Kultivierungsdauer unterliegen diese Zellen einer ersten Passage, d.h. sie werden in eine neue Kulturschale überführt. Dies wird als Sekundärkultur bezeichnet. Diese Zellen bilden nach einer Definition von Brauner 1989 [Brauner A et al 1989] eine Zelllinie. Aus diesen passageren Zelllinien können sich permanente Zelllinien entwickeln, die häufig den Karyotyp und den Differenzierungsgrad der Primärzellen verloren haben. [Bourque et al 1993]

Daneben gibt es noch eine weitere Definition der Primärkultur, welche aus der Virologie und Mikrobiologie kommt. Dort wird eine Primärkultur definiert als Zellen, die unmittelbar von einem tierischen oder menschlichen Organ gewonnen wurden.

Primärkulturen können je nach Ort ihrer Herkunft aus verschiedenen Zellarten bestehen. Durch Trypsin und / oder durch Entzug zweiwertiger Kationen (z.B. EDTA) können die Zellen von ihrer Kulturschale gelöst und dann in einen neuen Behälter erneut kultiviert werden (Passage oder Subkultivierung). Diese Sekundärkultur kann meistens nur noch unter Anwendung bzw. Zusatz von Wachstumsfaktoren oder speziellen Substraten weiter passagiert werden. [Brandis H et al 1994]

Vorteil der Primärkultur ist die dem Herkunftsort „in vivo“ entsprechende Zusammensetzung, wodurch eine äußerst exakte Simulation der „in vivo“ - Verhältnisse erreicht werden kann.

2. Permanente Zelllinien bestehen aus Zellen, die sich unbegrenzt oft teilen können. Solche unsterblichen Zellen entstammen meistens Tumorgewebe oder der Zellkultur selbst (z.B. durch Mutation oder Transformation durch Onkogene Viren bzw. kanzerogene Chemikalien). Diese permanenten Zelllinien differieren von der Primärkultur, sowohl morphologisch als auch funktionell, extrem stark. Die Zellen permanenter Zelllinien sind aneuploid, entdifferenziert und sie haben die Fähigkeit zur Kontaktinhibition verloren. Erste humane Zellen, die zur Zellkultur verwendet wurden (HeLa-Zellen von einem humanen Zervix-Ca) waren neoplastischen Ursprungs. [Rappaport H et al 1964] Es zeigte sich, dass diese Zellen auch unter identischen Bedingungen sehr große Unterschiede bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber Biomaterialien aufwiesen. [Johnson HJ et al 1983]

Aufgrund der oben beschriebenen Unterschiede zwischen den Zellarten und der Überlegung bzw. Berücksichtigung mit welchen ortständigen Zellen die Abriebpartikel „in vivo“ in Kontakt kommen, ist die humane Knochenmarkzellkultur die Kultur der ersten Wahl. Werden die in jüngerer Vergangenheit gewonnenen Erkenntnisse aus Studien mit primären ortständigen Knochenmarkszellen zur Biokompatibilitätsprüfung hinzu gezogen [Wilke et al 1991, 1993, 1999, 2000] zeigt sich, dass diese Zellkultur hohen Ansprüchen genügt. Zusätzlich bietet die humane Knochenmarkzellkultur den Vorteil, dass neben entdifferenzierten Zellen auch undifferenzierte Zellen vorkommen. Diese haben nach Abriebartikelzugabe noch die Möglichkeit, sich in die eine oder andere Richtung zu differenzieren. Es könnte sich zum Beispiel im Verlauf der Kultur eine Veränderung der Zellpopulation immunkompetenter Zellen zeigen.

Des weiteren wird durch dieses ortsspezifische Modell die Aussagefähigkeit verstärkt, da „in situ“ die Endoprothese in den proximalen Femur implantiert wird und das in dieser Studie verwendete Knochenmark aus dem Femurschaft gewonnen wird.

Gleichzeitig muss bedacht werden, dass bei Langzeit-Hüft-Totalendo-Prothesen-Trägern die Funktion der Abwehrzellen geschwächt ist, und dass es bei solchen Patienten selten zu einer Allergisierung kommen kann. Eine humane

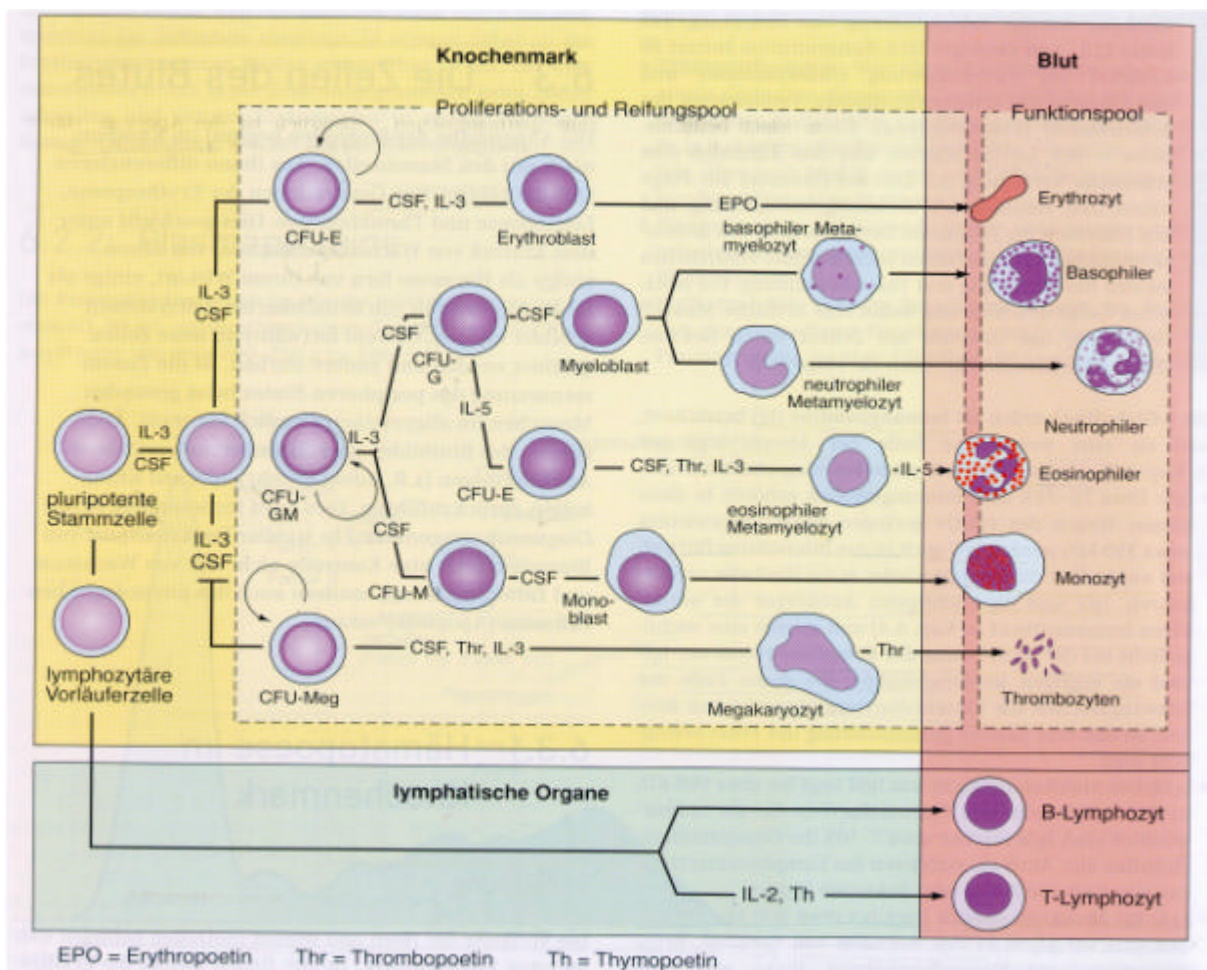
Knochenmarkzellkultur, welche unter anderem auch immunkompetente Zellen enthält, kann helfen auch diese Phänomene aufzuklären.

Zuletzt muss berücksichtigt werden, dass die Osteoblasten eine entscheidende Rolle bei der Integration des Implantates spielen und schließlich die Verankerung der Endoprothese ermöglichen. In der humanen Knochenmarkzellkultur können auch diese Zellen untersucht werden.

### 3.1.3 Hämatopoese im Knochenmark

Die „Ahnenreihe“ der Blutzellen beginnt im Knochenmark mit den sogenannten pluripotenten Stammzellen. Aus ihnen differenzieren sich zahlreiche Generationen der Erythropoese, Leukopoese und Thrombopoese. Dieses erfolgt unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren. Sie werden zum Teil fern von ihrem Wirkort und zum Teil lokal von benachbarten Zellsystemen gebildet. Änderungen des Zellbildes ergeben sich vor allem dann, wenn man veränderte Anforderungen des Organismus vorfindet (z.B. Entzündungen, Infekt, etc.).

Die Vorläuferzellen befinden sich im roten Knochenmark. Das blutbildende Knochenmark beim Erwachsenen (ca. 1,7 l) enthält etwa  $10^{12}$  hämatopoetische Vorläuferzellen.



**Abb.1:** Schematische Darstellung der Hämatopoese. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nicht alle Differenzierungsstufen dargestellt. [Kayser FH et al 1998]

Diese pluripotenten Zellen besitzen die Fähigkeit zur Differenzierung und Proliferation. Sie lassen sich nur funktionell und nicht morphologisch identifizieren. Man bezeichnet sie auch als „Colony forming units“ (CFU), da sie bei Einpflanzung in ein fremdes Gewebe zur Ausbildung von determinierten Vorläuferzellkolonien, den ersten Vertretern der roten bzw. weißen „Ahnenreihe“, führen.

Nicht alle der zahlreichen Differenzierungsschritte in der Generationsfolge der verschiedenen Blutzellen sind im Detail bekannt. Eine wichtige Rolle spielen die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren. Sie werden auch als „Colony stimulating factors“ (CSF) bezeichnet, weil sie die Differenzierung oder Proliferation stimulieren. Es handelt sich dabei um kleine Peptide, die als parakrin freigesetzte Wirkstoffe lokal ihre Wirkung entfalten. Auch klassische Hormone, wie etwa die Katecholamine, Steroidhormone, Schilddrüsenhormone oder das Wachstumshormon haben einen Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation der Zellen.

Die erythropoetisch, granulocytopoetisch, monozytopoetisch bzw. thrombozytopoetisch determinierten Vorläuferzellen werden entsprechend der Nomenklatur als CFU-Erythropoetisch, CFU-Granulocyte-Monocyte, CFU-Megakaryocyte (CFU = Colony forming Unit), etc. bezeichnet.

Die verschiedenen Determinierungsschritte werden durch Wachstumsfaktoren, die als Granulozyten-CSF, Monozyten-CSF bezeichnet werden und durch Interleukine (IL-3 und IL-5) stimuliert.

So durchlaufen die Vorläuferzellen den Proliferationspool, um über den Reifungspool den Funktionspool zu erlangen. [Kayser FH et al 1998]

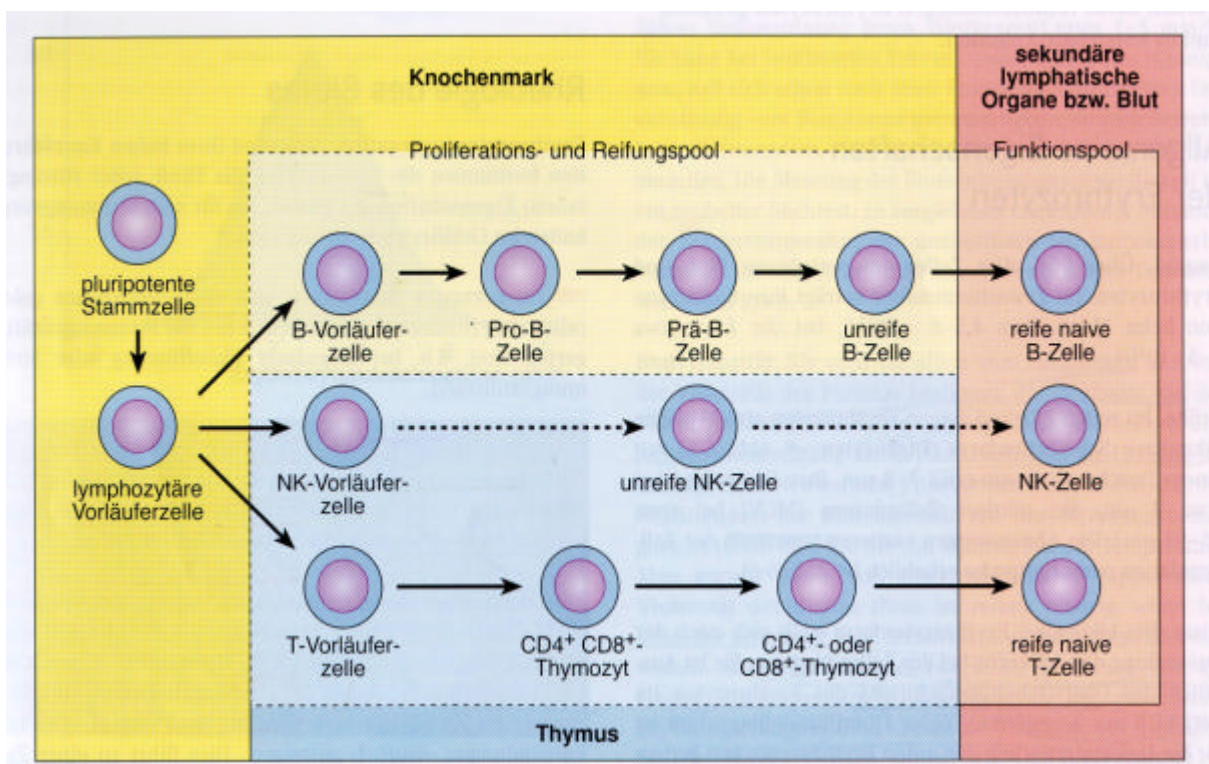


### 3.1.5 Leukopoese im Knochenmark

In dieser Studie ist die Leukopoese von besonderem Interesse. Aus den pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks entwickeln sich die myeloischen bzw. monozytären Progenitor-Zellen der Granulozyten und Monozyten sowie die lymphatischen Progenitor-Zellen.

Die Differenzierung in die funktionstüchtigen verschiedenen Granulozyten wird durch humorale Mediatoren (G-CSF, Eo-CSF) und vor allem durch die Interleukine IL-3, IL-5 stimuliert. Auch der reife Monozyt geht aus der determinierten Stammzelle CFU-GM in mehreren Schritten hervor.

Die Lymphopoese nimmt ihren Ausgang im Knochenmark. Die Produktion reifer Lymphozyten bedarf eines Differenzierungsschrittes in den primären lymphatischen Organen (Knochenmark, Thymus).



**Abb.2:** Stark vereinfachte Darstellung der Lymphozytenreife [Kayser FH et al 1998]

Es werden zwei Arten von Lymphozyten unterschieden: T-Lymphozyten werden unter dem Einfluss von Thymopoetin und IL-2 im Thymus, B-Lymphozyten im Knochenmark geprägt.

Die Reifung der B- und T-Lymphozyten ist eng mit der Entstehung der Immunabwehr verknüpft. Natürliche Killerzellen gehen ebenfalls aus den lymphatischen Vorläuferzellen hervor, unterscheiden sich jedoch von T- und B-Lymphozyten in ihrem Differenzierungsweg und ihrer Funktion. [Kayser FH et al 1998]

### ***3.1.6 Unspezifische Abwehr***

Unspezifische Abwehrmechanismen werden im Gewebe stets von vorhanden neutrophilen Granulozyten und Makrophagen getragen.

Beim Eindringen von Fremdkörpern (in dieser Studie Abriebpartikel) in das Gewebe werden Granulozyten in das betroffene Gebiet rekrutiert. Später folgen die Monozyten, die sich im Gewebe zu Makrophagen umwandeln. Diese Rekrutierung aus dem Blut erfordert spezifische Interaktionen der Leukozyten mit dem Endothel. Am Entzündungsort werden diese Fremdkörper, sofern dies möglich ist phagozytiert, abgebaut und entsorgt.

Neutrophile emigrieren im Rahmen einer Entzündungsreaktion aus dem Blut. Dieser Prozess ist auch als Extravasation bekannt und wird in mehrere Schritte unterteilt.

Zunächst kommt es im Bereich der Entzündung (hier im periartikulären Gewebe) zur Produktion von Entzündungsmediatoren. Diese Zytokine (IL-1, TNF) regen Endothelzellen der benachbarten Gefäße an, weitere Zytokine und Adhäsionsmoleküle zu produzieren.

Nach der Emigration aus dem Gefäß in das Gewebe werden die neutrophilen Granulozyten und Monozyten durch chemotaktisch wirksame Substanzen an den Ort der Entzündung gelockt. Diese Chemotaxine können zum einen von eingedrungenen Fremdkörpern selbst freigesetzt werden (Lipopolysaccharide, Peptide), von emigrierten Makrophagen und Neutrophilen stammen (IL-8, PAF, LTB<sub>4</sub>) oder beim Kontakt mit Fremdmaterial (Partikel) gebildet werden (z.B. Complement C5<sub>a</sub>). Darüber hinaus können noch ortständige Makrophagen aktiviert werden. [Kayser FH et al 1998]

### ***3.1.7 Entzündung und spezifische Reaktion***

Eine akute Entzündung ist im Allgemeinen lokal begrenzt und wird einerseits durch Fremdkörper, andererseits durch Schädigung körpereigener Zellen hervorgerufen. Beides erfolgt bei der aseptischen, frühzeitigen Prothesenlockerung infolge des Partikelabriebs lokal im periprothetischen Raum.

Allen Entzündungen haben gemeinsam, dass Entzündungsmediatoren (IL-6, IL-1, IL-8, TNF-alpha, etc.) freigesetzt werden. Sie locken Phagozyten an den Ort des Geschehens und aktivieren und induzieren charakteristische Veränderungen im betroffenen Gewebe. Durch lokale Vasodilatation wird die Durchblutung erhöht, die zur Erwärmung und Rötung in diesem Gebiet führt. Gleichzeitig verlangsamt sich die Blutströmung, um die Margination der Leukozyten zu fördern. Die aus der erhöhten Gefäßpermeabilität resultierende Schwellung führt durch den erhöhten Gewebedruck zum Schmerz. Infolge der Gefäßpermeabilität kommt es zum Austritt von Immunglobulinen, Komplementfaktoren, Fibrinogen und anderen Bestandteilen des Blutplasmas, welche die Abwehr des Fremdmaterials erleichtern. Der gleichzeitig erhöhte Lymphstrom führt dazu, dass die Abriebpartikel sich entlang der Lymphbahnen in den regionären Lymphknoten ablagern und sich in verschiedenen Organen wiederfinden lassen.

Bei der akuten Entzündungsreaktion werden ortständige Makrophagen innerhalb von einigen Minuten mobilisiert und beginnen mit der Phagozytose und der Produktion von Entzündungsmediatoren. Danach erfolgt der Imigrationsprozeß der Granulozyten, deren Reservepool stark erhöht werden kann. In der weiteren Phase werden Blutmonozyten rekrutiert, die sich im Gewebe zu Makrophagen umwandeln. Schließlich setzen systemische Veränderungen ein. GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-1 führen wiederum zur Vermehrung der Granulozyten und Monozyten.

Die akute Entzündung wird beendet, wenn die schädigenden Abriebpartikel beseitigt worden sind. Sie kann auch unter weiterer Einwirkung von Mediatoren (IL-1, IL-6, IL-12, etc.) in eine spezifische Abwehr münden. Hierbei kommt es zur B-Zell- und T-Zell-vermittelten spezifischen Abwehr des Organismus. [Kayser FH et al 1998]

### ***3.1.8 Lokale Regulation des Knochenwachstums***

Der Knochenstoffwechsel wird von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst (Zytokine, Wachstumsfaktoren und physikalische Krafteinwirkung). Die Zytokine stehen im Moment im Mittelpunkt des Interesses, da sie anscheinend eine entscheidende Rolle im normalen, aber auch im pathologischen Knochenstoffwechsel einnehmen. Eine Vielzahl von Zytokinen, die ursprünglich aufgrund ihrer immunologischen und hämatopoetischen Effekte charakterisiert wurden, sind in die Regulation des Knochenstoffwechsels eingebunden.

Zu den verschiedenen Regulatoren des Knochenstoffwechsels gehören:

- Interleukin-1 („Osteoclasts-activating-factor“ OCAF)
- Tumornekrosefaktor (TNF)
- Lymphotoxin
- Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )
- Interleukin-10 (IL-10)
- Interleukin-4 (IL-4)
- Leukämie-Inhibitor-Faktor / Interleukin-6-Familie (LIF / IL-6 ~ Osteoklasten stimulierender Faktor = OSF)
- Zusätzliche Zytokine (MCP-1, MCP-2, IL-8)

[Kayser FH et al 1998]

## 3.2 Zytokine und Wachstumsfaktoren

Zytokine sind biologisch aktive Hormone, meistens Glykoproteine, die auf Zellen mit entsprechenden Rezeptoren verschiedenste biologische Effekte erzielen. [Abbas AK et al 1993]

Je nach Ursprung des Zytokins werden auch andere Begriffe verwendet:

- Monokine für Interleukine, die von Makrophagen / Monozyten gebildet werden
- Lymphokine für solche, die von Lymphozyten gebildet werden [Peter A et al 1996]

Der Begriff Interleukine wird für Zytokine verwendet, die hauptsächlich Zellinteraktionen beeinflussen. Alle Zytokine sind zellregulatorische Eiweiße mit einem Molekulargewicht von unter 60 000 Dalton (meist unter 20 000 Dalton). Die Interleukine werden lokal produziert und haben nur sehr kurze Halbwertszeiten von Sekunden bis Minuten. Sie sind bereits in pikomolaren Konzentrationen wirksam, wirken parakrin (d.h. in der Nähe ihres Produktionsortes) und oft autokrin (d.h. sie wirken auf die produzierende Zelle selbst). Die Zytokine interagieren mit hochspezifischen Zellrezeptoren und induzieren zellspezifische oder allgemeine Effekte (Freisetzung von Mediatoren, Expression von Differenzierungsmolekülen, Regulation der Expression bestimmter Zelloberflächenmoleküle).

Zytokine haben meistens pleiotope Wirkung, das heißt sie haben mehrere gleiche oder unterschiedliche Wirkungen auf eine oder mehrere Zellarten. Bezüglich ihrer Funktion können Zytokine wie folgt zusammengefasst werden:

- Entzündungsfördernd: **IL-1**, **IL-6**, IL-8, **TNF- $\alpha$** , TGF- $\beta$
- Entzündungshemmend: IL-10, IL-13, TGF- $\beta$
- Hämatopoese-fördernd: G-CSF, M-CSF, **GM-CSF**, **IL-3**, IL-5, IL-7
- Immunregulatorisch: IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IFN $\gamma$ , TGF- $\beta$
- Anti-infektiös: IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  (Viren), **TNF- $\alpha$**  (Bakterien)
- Anti-proliferativ: IFN- $\gamma$ , **TNF- $\alpha$** , TGF- $\beta$

[Kayser FH et al 1998]

[markierte Zytokine wurden in der vorliegenden Studie untersucht bzw. verwendet]

## Wachstumsfaktoren der Myelopoese

<b>Faktor</b>	<b>Effektorzellen</b>	<b>Bildungsorte</b>
Erythropoetin (EPO)	erythropoetische Stammzellen	Interstitialzellen der Niere
Interleukin-3 (IL-3)	pluri-, uni- und bipotente myeloische Stammzellen, neutrophile, monozytäre, eosinophile, basophile und megakaryozytäre Reihe	T-Lymphozyten Epidermis
Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	uni- und bipotente myeloische Stammzellen, neutrophile, monozytäre, eosinophile, megakaryozytäre Reihe, Makrophagen	T-Lymphozyten Endothelzellen Fibroblasten
Granulozyten-CSF (G-CSF)	neutrophile Reihe	Makrophagen Fibroblasten
Makrophagen-CSF (M-CSF)	monozytäre Reihe und Makrophagen	Fibroblasten Makrophagen Endothelzellen

**Tabelle 1:** Wachstumsfaktoren der Myelopoese, deren Produktionsort und deren Effektorzellen

### ***3.2.1 Kolonie-stimulierender Faktor (CSF)***

Im Knochenmark finden sich die „pre-cursor-cells“, die später die zelluläre Basis des „bone remodeling“ bilden.

Die knochenabbauende Zelle, der Osteoklast, hat seine Abstammung in einer hämatopoetischen Vorläuferzelle, in der „Colony-forming unit granulocyte / Makrophage“ (CFU-GM). [Hagenaars CE et al 1991, Harris SE et al 1994, Kurihara N et al 1990]

Die knochenaufbauenden Zellen, der Osteoblast und der Osteozyt stammen von mesenchymalen Vorläuferzellen der Stroma-Fibroblasten ab, von den „colony-forming unit fibroblasts“ (CFU-F). [Owen M 1985]

Die Knochensubstanz scheint einen positiven Einfluss auf die Hämatopoese zu haben. Hämatopoese findet stets dort statt, wo auch eine Knochenneubildung erfolgt. Bei der Knochenneubildung wandern zuerst Osteoklasten in das entsprechende Gebiet ein und resorbieren den kalzifizierten Bereich. Als Resultat entsteht eine primitive Knochenmarkhöhle in der die Hämatopoese induziert wird. Osteoblasten-Zelllinien kontrollieren scheinbar die Rekrutierung der Osteoklasten und deren Aktivität durch Synthese von verschiedenen lokalen Mediatoren, welche direkt auf die Vorläuferzellen und reifen Osteoklasten wirken. [Chambers TJ 1992, Suda T et al 1995]

Das bedeutet, dass es ohne diese knochenbildenden Zellen praktisch unmöglich ist, ein Einwandern von Knochenmarkszellen mit anschließender Hämatopoese zu erreichen, und damit gleichzeitig auch eine gute Knochenbildung zu erlangen.

Neben ihrem Einfluss auf die Entwicklung von Osteoklasten scheinen diese knochenbildenden Zellen die Hämatopoese allgemein zu unterstützen. Diese These wurde bereits 1986 von Frisch and Eventov untermauert. [Frisch-Eventov 1986] Sie zeigten, dass eine enge Beziehung zwischen Knochenneubildung und aktiver Hämatopoese besteht. Das Gegenteil davon ist in atrophischen Knochen zu finden. Schon 1925 wurde von Pommer [Pommer G 1925] eine Verbindung zwischen Osteopenie und inaktiver Hämatopoese beschrieben. In der Zwischenzeit haben viele weitere Studien [Burkhardt R 1987, Frisch-Eventov 1986, Hiarno T et al 1992, Lips P et al 1985, Meunier P et al 1971] dieses Phänomen untersucht und zeigten, dass das



Volumen von inaktivem Knochenmark, unabhängig vom Alter, sowohl dem Grad der Osteopenie als auch den histomorphologischen Kriterien für eine zu geringe Knochenbildung entspricht.

Der Knochen kann durch Bereitstellung von bestimmten Faktoren den Prozess der Hämatopoese unterstützen.

Im Knochenmark kommt es durch Proliferation und Differenzierung von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen zu „pre-cursor-cells“ bestimmter Zelllinien.

Dieser Vorgang unterliegt dem Einfluss Kolonie-stimulierender Faktoren (CSF). [Metcalf D 1984] Diese Gruppe von CSF umfasst Interleukin-3 (Multi-CSF), Granulozyten / Makrophagen-CSF (GMCSF), Granulozyten-CSF (G-CSF) und CSF-1 (Makrophagen-CSF).

Die CSF werden von den knochenbildenden Zellen produziert, um lokal die Rekrutierung von Osteoklasten und Hämatopoese zu stimulieren.

### ***3.2.2 Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)***

GM-CSF stimuliert das Wachstum von Granulozyten und Makrophagen. GM-CSF weist allerdings nur bei hohen Konzentrationen gewisse Ähnlichkeiten zu IL-3 auf, indem es auch hier zu einer Stimulation des Wachstums von Eosinophilen, Megakaryozyten, Erythrozyten und verschiedenen Progenitor-Zellen kommt. [Rasko JE et al 1994]

GM-CSF wird von verschiedenen Zell-Typen produziert:

- T-Lymphozyten,
- Makrophagen,
- Endothel-Zellen
- Stroma-Zellen,
- Fibroblasten und
- Osteoblasten

[Rasko JE et al 1994]

Humanes GM-CSF besteht aus 144 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 23kDa (SDS-Page). Die Glycosylierung der Aminosäure-Ketten scheint nicht von essentieller Bedeutung für die Aktivität von GM-CSF zu sein, führt aber wahrscheinlich zu einer verminderten Affinität zwischen Ligand und Rezeptor.

Der Rezeptor des GM-CSF ist ein hetero-Dimer, bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette. Die  $\alpha$ -Kette alleine würde nur mit einer geringen Affinität zu GM-CSF binden. Die  $\beta$ -Kette, welche alleine überhaupt keine messbare Bindungsaffinität zu GM-CSF hat, ist in der Lage den GM-CSF /  $\alpha$ -Ketten-Komplex soweit umzuwandeln, dass die Affinität steigt ( $K_d \sim 50\text{pM}$ ). [Rasko JE et al 1994]

Felix und Mitarbeiter 1988 [Felix R et al 1988] und auch Horowitz und Mitarbeiter 1989 [Horowitz CM et al 1989 a,b,c, 1991] zeigten anhand primärer Osteoblasten und Osteoblastenzelllinien, dass GM-CSF in erheblichen Maße produziert wird, wenn Lipopolysaccharide oder TNF-alpha anwesend sind. Dieser GM-CSF Anstieg kann

schließlich auch zu Stimulation der Osteoklasten-Formation und damit konsekutiv zur Knochenresorption führen.

GM-CSF ist an der frühen Entwicklung hämatopoetischer Vorläufer-Zellen, welche die Vorstufen von Osteoklasten sind, sowie an der Entwicklung anderer hämatopoetischer Zellen beteiligt. [Kurihara et al 1989; Kerby et al 1992; Kurihara et al 1990]

GM-CSF unterstützt möglicherweise auch die Differenzierung von späten Stufen der Osteoklasten-Genese, allerdings ist GM-CSF kein essentieller Faktor der Osteoklasten-Genese. [Drannoff et al 1994; Hattersly et al 1991]

### ***3.2.3 Interleukin-3 (IL-3; Multi-Kolonie-stimulierender Faktor)***

Die Aktivität von IL-3 auf normale Zellen scheint vor allem auf Abkömmlinge der pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen beschränkt zu sein. IL-3 hat die breiteste Spezifität unter allen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren. [Schrader JW 1994]

IL-3 kann die Proliferation und Differenzierung von

- Makrophagen
- Neutrophilen
- Eosinophilen
- Basophilen
- Mastzellen
- Megakaryozyten und
- Erythroblasten stimulieren.

Vor allem IL-3 induziert die Differenzierung von primitiven pluripotenten Stammzellen zu Myeloblasten und Erythroblasten.

IL-3 ist ein Glycoprotein, bestehend aus 133 Aminosäuren. IL-3 wird von T und B-Lymphozyten produziert und als Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 22000-36000 Dalton, je nach Grad der Glycosylierung, sezerniert.

Der IL-3-Rezeptor ist Bestandteil einer großen hämatopoetischen Rezeptor-Superfamilie. Der IL-3-Rezeptor ist analog zum GM-CSF-Rezeptor und IL-5-Rezeptor ein hetero-Dimer, bestehend aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette. Die homologen  $\alpha$ -Ketten sind spezifisch für jeden einzelnen Rezeptor und zeigen jeweils nur eine geringe Affinität zu den Zytokinen. Die größere  $\beta$ -Kette ist dagegen nicht für einen Rezeptor spezifisch; sie zeigt auch keinerlei Affinität zu den Zytokinen. Der Komplex aus  $\alpha$ -Kette plus Ligand ist in der Lage, zusammen mit der  $\beta$ -Kette einen Komplex mit hoher Affinität zu bilden ( $K_d \sim 10^{-10}$  M). [Nishinakamura R et al 1995]

Die Proliferation und Differenzierung der Osteoklasten erfolgt in Anwesenheit von Interleukin-3.

Tabelle 10.2-3 Das myeloische System.

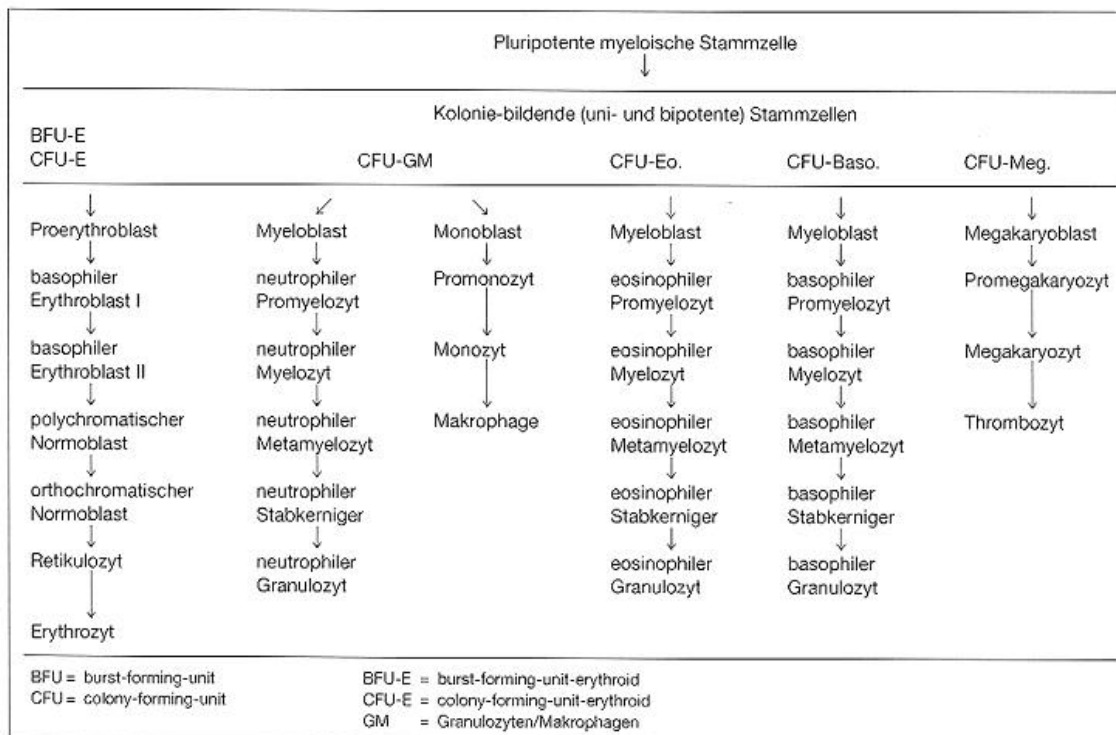


Tabelle 2: Das myeloische System [Benninghoff Anatomie 1996]

### 3.2.4 Interleukin-1b (IL-1b)

IL-1 ist ein multifunktionelles Zytokin mit einem weiten Wirkspektrum in einer Vielzahl von Zielgeweben. IL-1 gehört zu einer Familie mit zwei aktiven Peptiden, IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , welche von zwei verschiedenen Genen kodiert werden.

Beide Formen von IL-1 haben identische Fähigkeiten. [Dinarello CA 1991]

IL-1 war der erste Mediator im Immunsystem, bei dem ein Einfluss auf den Knochenstoffwechsel nachgewiesen wurde. [Gowen M et al 1993, Canalis E 1986,1987 ;Lorenzo JA et al 1987] Die Hauptaktivität von IL-1 im Knochenstoffwechsel besteht in seiner Funktion als Osteoklasten-aktivierender-Faktor (OCAF). [Dewhirst FE et al 1985]

IL-1 ist bis jetzt der stärkste bekannte Stimulator der Knochenresorption. Zum Teil wird dieses durch die IL-1 vermittelte Induktion der Prostaglandinsynthese erklärt, da Prostaglandine selbst starke Stimulatoren der Knochenresorption sind.

Zusätzlich zur Funktion von IL-1 als Stimulus der Knochenresorption, zeigt IL-1 eine inhibitorische Wirkung auf die Neubildung von Knochen. [Canalis E 1986,1987]

Die Produktion von IL-1 ist bislang noch nicht ganz aufgeklärt. Makrophagen, Epithelzellen und eventuell auch tote Zellen sind Produktionsstätten von IL-1. [Horowitz SM 1989 a,b,c]

Als Rezeptoren von IL-1 sind bislang zwei Typen bekannt. [Dinarello CA 1991]

Die gesamten biologischen Effekte werden allerdings nur über den Typ I-Rezeptor vermittelt. [Sims JE et al 1993] Der Typ II-Rezeptor scheint kaum oder keinerlei Typ-1-agonistische Aktivität zu besitzen. Seine Funktion besteht als eine Art Lockvogel für IL-1, um die Aktivität des IL-1-Typ I-Rezeptors durch Bindung von IL-1 zu vermindern. Zusätzlich kann der IL-1-Typ II-Rezeptor ins Blut abgegeben werden, um dort IL-1 zu binden. [Dinarello CA 1993] Zusätzlich ist der IL-1-Typ II-Rezeptor in der Lage, gemeinsam mit dem IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra) die Aktivität des IL-1-Typ I-Rezeptors zu senken. [Burger D et al 1995]

IL-1ra ist ein IL-1-Analogon, welches an den IL-1-Rezeptor bindet, aber nicht zu dessen Aktivierung führt. IL-1ra blockiert somit die Knochenresorption und auch die PGE<sub>2</sub>-Produktion.

### ***3.2.5 Tumornekrosefaktor-a und -b (TNF-a und TNF-b)***

TNF gehört ebenso wie IL-1 zu einer Familie, die aus 2 verwandten Polypeptiden ( $\alpha$  und  $\beta$ ) besteht. TNF- $\alpha$  und - $\beta$  haben ähnliche biologische Aktivitäten und sind potente Stimulatoren der Knochenresorption. [Bertolini DR et al 1986, Lorenzo JA et al 1987] Zusätzlich sind sie starke Inhibitoren der Knochen-Kollagenbiosynthese. [Bertolini DR et al 1986, Canalis E 1987] Die Effekte von TNF auf die Knochenresorption scheinen über eine gesteigerte Rekrutierung von Osteoklasten zu laufen. [Johnson RA et al 1989]

Ähnlich dem IL-1, kann auch TNF die Ausbildung von Osteoklasten-ähnlichen Zellen und deren Differenzierung beschleunigen. [Pfeilschifter J et al 1989]

Für TNF und für IL-1 zeigte sich jedoch in reinen Osteoklasten-Kulturen keine direkte Wirkung auf die Knochenresorption. Daneben entfaltet sich die knochenresorptive Wirkung durch Osteoklasten nur dann, wenn Osteoblasten anwesend waren. Daher werden die Effekte von TNF wahrscheinlich über andere Zellen vermittelt. [Thomson BM et al 1987]

TNF- $\alpha$  wird von Osteoblasten-ähnlichen-Zellen produziert und durch IL-1, GM-CSF, und Lipopolysaccharid stimuliert.

TNF besitzt zwei verschiedene Rezeptoren, den TNF-Rezeptor-1 oder p55 und den TNF-Rezeptor-2 oder p75. [Fiers W 1993]

Im Gegensatz zu IL-1 haben hier beide Rezeptoren eine biologische Aktivität. Vermutlich besteht zwischen beiden Rezeptoren eine Interaktion und es bedarf für eine Vielzahl von Rezeptor-Antworten eine Aktivierung beider Rezeptoren. [Vandenabeele B et al 1995]

Manche Effekte können allerdings nur durch selektive Aktivierung eines Rezeptors vermittelt werden. [Sheehan KC et al 1995]

TNF zeigt neben der knochenresorptiven Wirkung, ähnlich dem IL-1, eine inhibitorische Komponente auf die Knochenneubildung. [Bertolini DR et al 1986]

### 3.2.6 Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 gehört zusammen mit IL-11, Leukämie-Inhibitor-Faktor (LIF), Onkostatin M (OSM), „ciliary neutrotrophic factor“ (CNTF) und Cardiotropin 1 (CT-1) zu einer Subpopulation multifunktionaler Zytokine, die ihre biologischen Effekte über eine Aktivierung derselben Signaltransduktionskette erzielen. Diese Gruppe wird als sogenannte „IL-6-type cytokines“ bezeichnet. [Sehgal PB et al 1995]

IL-6, IL-11 und CNTF binden an Rezeptoruntereinheiten, welche das entsprechende Zytokin erkennen, aber nicht direkt an der Signaltransduktion teilnehmen ( $\alpha$ -Untereinheit).[Hilton DJ et al 1994, Kishimoto T et al 1994, Taga T et al 1989] Unabhängig davon ob ein Zytokin an die  $\alpha$ - oder direkt an die  $\beta$ -Untereinheit bindet, erfolgt die Bildung von Homodimeren Glycoprotein-130 (gp130) oder der Glycoproteine-130 mit einer zusätzlichen gp-130-assoziierten  $\beta$ -Untereinheit.

Ferner existiert die  $\alpha$ -Untereinheit von IL-6 in einer löslichen Form. Diese funktioniert jedoch nicht als Antagonist, sondern als Agonist, indem sie nach Bindung ihres spezifischen Zytokins mit der Signaltransduktionskomponente der Zelloberfläche in Interaktion tritt. [Taga T et al 1989, Davis S et al 1993] Die nach Liganden-Bindung induzierte Dimerisierung der  $\beta$ -Untereinheit führt zu einer Aktivierung eines intrazellulären Signaltransduktionsweg (über eine Aktivierung von Rezeptor-abhängigen Tyrosinkinasen: Janus-Kinasen  $\equiv$  JAKS). [Kishimoto T et al 1994] Die JAKS phosphorylieren ihrerseits verschiedenen Proteine, einschließlich der  $\beta$ -Untereinheit, der Kinasen, sowie eine Reihe von zytoplasmatischen Proteinen, sogenannten STATs („signal transducers and activators of transcription“).[Feldmann GM et al 1994]

Diese Phosphorylierung der STATs führt zur Ausbildung von Proteinkomplexen, welche in den Zellkern einwandern und dort ihre Funktion der Gen-Transkription erfüllen können. [Kurihara N et al 1990, Feldmann GM et al 1994]

Die Hauptfunktion von IL-6 besteht in seiner Fähigkeit Osteoklasten-Vorläuferzellen zu stimulieren (IL-6 ~ Osteoklasten stimulierender Faktor = OSF). [Roodmann GD et al 1992 a, b 1993] Daneben können auch systemische Hormone (PTH, VitD, T3/T4) den



Knochenstoffwechsel direkt beeinflussen oder indirekt Einfluss auf die Produktion von IL-6 nehmen. [Bellido T et al 1995, de la Mata J et al 1995, Jilka RL et al 1992]

IL-6 unterstützt synergistisch mit IL-3 die Produktion von CFU-GM („colony forming units granulocyte/macrophage“) und stimuliert die Differenzierung von frühen Osteoklasten-Vorläuferzellen aus CFU-GM. [Kurihara N et al 1991]

Ferner stimuliert Interleukin-6 die Ausbildung von reifen Osteoklasten und damit in Kooperation mit Interleukin-1 die Resorption von Knochen „in vivo“. [Black J et al 1987,1991]

Interleukin-6 scheint jedoch keinen Effekt auf die Knochenresorption in der Neugeborenen-Kalvaria zu haben, welche einen hohen Anteil an Osteoklasten-Progenitor-Zellen und relativ wenig myeloische Progenitor-Zellen besitzt. [al Humidan A et al 1991]

Ferner führt Interleukin-6 in Kombination mit seinem löslichen Rezeptor zur Stimulation von Osteoklasten. [Suda T et al 1995]

IL-6 scheint keine Rolle in der Entwicklung von Osteoklasten-Progenitor-Zellen im Knochenmark zu spielen. [Jilka RL et al 1992]

Bislang ist es unklar, ob Interleukin-6 seinen Einfluss auf die Osteoklasten-Genese über Rezeptoren auf Osteoklasten-Progenitor-Zellen oder via Rezeptoren auf Osteoblasten ausübt. Möglicherweise erfolgt der Ablauf über beide Wege.

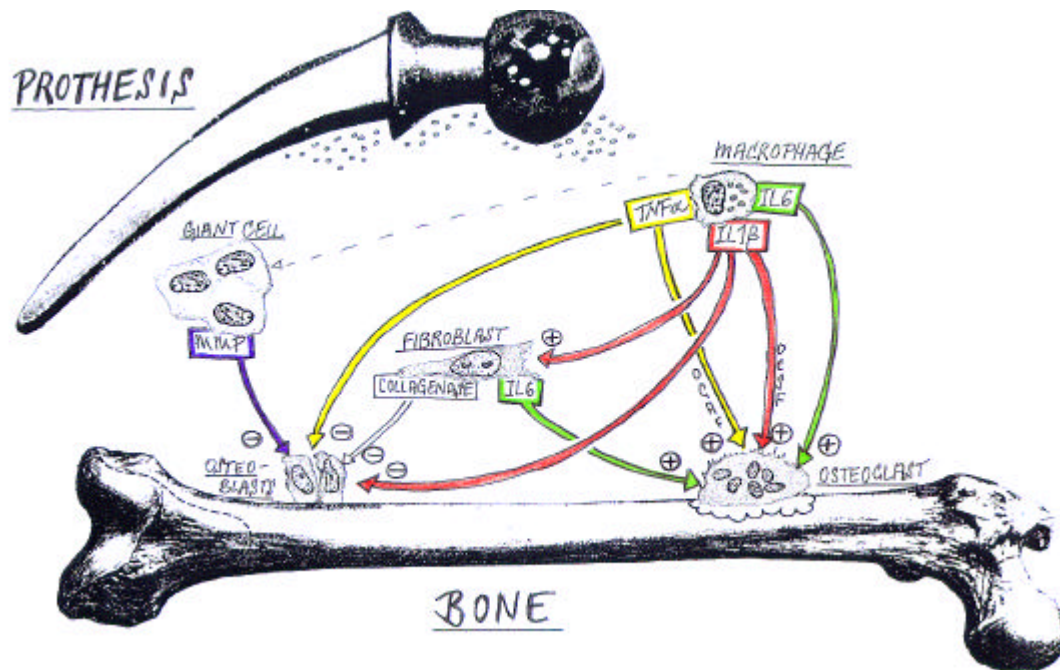
### ***3.3 Fragestellung***

Ziel dieser Studie war es anhand einer humanen Knochenmarkzellkultur zu zeigen, ob zugesetzte Tivaniumpartikel, zu einer erhöhten Freisetzung proinflammatorisch und osteolytisch wirkender Mediatoren führen und möglicherweise auf diesem Wege zu einer Lockerung von Endoprothesen und zu einer erhöhten Revisionsrate beitragen können.

In dieser Studie wurden die Zytokine Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-6 (IL-6) analysiert. Von diesen lokalen Einflussgrößen ist bekannt, dass sie einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel haben. [Canalis E 1987, Vaes G 1988, Zheng MH et al 1992]

Die Aufgabe dieser Studie war es, die humane Knochenmarkzellkultur mit Abriebpartikel von Titan-Aluminium-Vanadium zu versetzen und diese auf eine mögliche Änderung des Zytokinprofils und Zelltoxizität zu untersuchen. Zusätzlich erfolgte eine FACS-Analyse / Zelldifferenzierung („fluorescence activating cell sorter“), um eine mögliche Änderung in der Zusammensetzung der humanen Knochenmarkzellkultur nach Partikelexposition zu erfassen. Hierbei wurde vor allem Wert auf eine mögliche Änderung der Anzahl von B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten bei sonst konstanten Versuchsbedingungen in Abhängigkeit der Menge von Abriebpartikeln gelegt.

Abschließend soll ein Vergleich zwischen dieser Studie und anderen Zellkulturstudien gezogen werden und eine Interpretation der verschiedenen Ergebnisse erfolgen.



**Abb.3:** Beispielhafte Darstellung des Zusammenspiels verschiedener Faktoren im Rahmen der sog. Partikelkrankheit. [Wilke et al 1998]

## IV. Material und Methoden

### 4.1 Knochenmarkspräparation

1991 wurde von Kalla und Mitarbeitern [Kalla P et al 1991] gezeigt, dass erhebliche Unterschiede bei der Isolation von humanen Knochenmarkzellen im Rahmen einer Sternalpunktionaspiration und einem bei einer totalen Hüftgelenkendoprothesen-Operation gewonnenen Spongiosablock bestehen. Obwohl beide Quellen der Zellpopulation-Zusammensetzung von humanen Knochenmark entsprachen, konnten Kalla und Mitarbeiter [Kalla P et al 1991] zeigen, dass die absolute Zellzahl bei der Sternalpunktion immer geringer war als im Vergleich zur absoluten Zellzahl beim Spongiosablock.

**Patienten:**

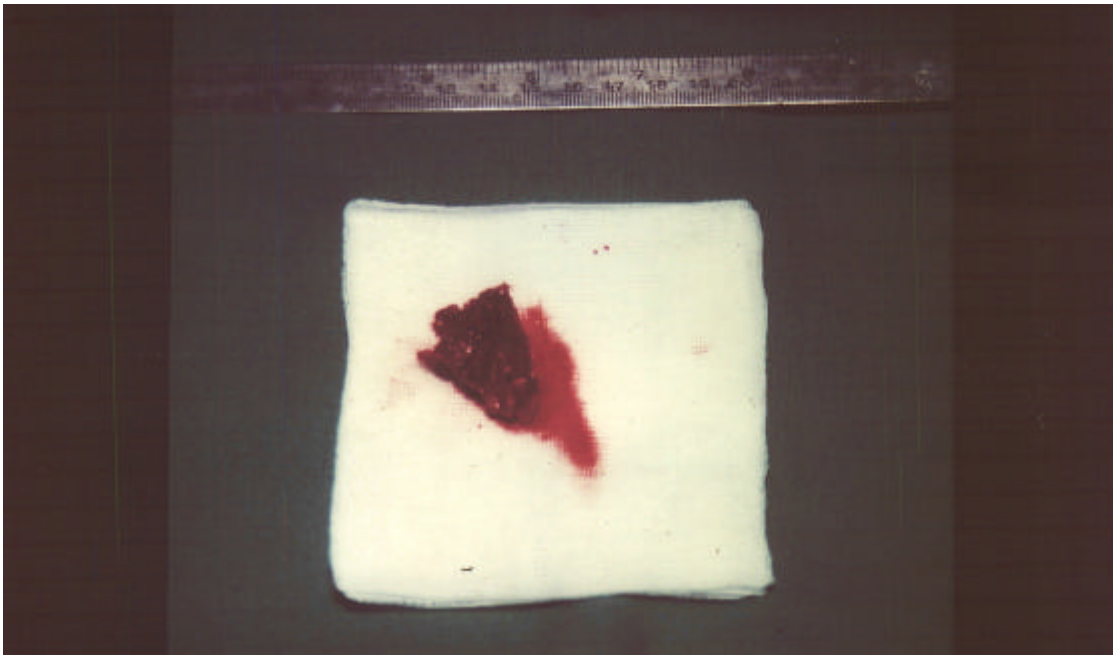
Das Patientengut bestand aus 6 gesunden Patienten (3 männlich und 3 weiblich), die zwischen 40 und 75 Jahre alt und „nur“ mit einer Coxarthrose behaftet waren. Alle Patienten hatten vor der Operation eine Eigenblutspende durchgeführt und waren zur Knochenmarkspende vorgesehen. Beide Verfahren gewährleisteten die serologische Testung der Patienten.

Im Rahmen einer totalen Hüftgelenkendoprothese (Hüft-TEP) wurde nach Femurkopfosteotomie, Knochenmark steril aus dem proximalen Femurschaft entnommen. (Ethikkommission genehmigt, Fragebogen, AZ 4/97, siehe Anhang).



**Abb.4:** Entfernung des Spongiosablocks nach Femurkopfosteotomie während einer Hüft-TEP;

Dabei wurde ein spongiöser, markhaltiger Block von etwa 7x10x20 mm (siehe Abbildung 4) aus dem proximalen Femurschaft entnommen. Um eine Blutgerinnung und Austrocknung des Knochenmarks zu verhindern, wurde der Spongiosablock in einem sterilen Behälter mit liqueminhaltigen Phosphatpuffer (0,2% Liquemin Fa. Hoffmann-La Roche; PBS pH 7,4 Fa. Seromed) aufbewahrt.



**Abb.5:** Spongiosablock nach Entnahme

Unter einem Lamina-Airflow wurde anschließend der Spongiosablock (siehe Abbildung 5) weiterverarbeitet.

Zunächst wurde mittels einer sterilen Zange der Spongiosablock unter Zugabe von PBS (Phosphat buffered saline = PBS) mechanisch zerkleinert, anschließend wurde die so gewonnene Suspension durch ein steriles Sieb mit einer Porengröße von 0,1 mm von den spongiösen Anteilen getrennt. Bei jeder Knochenmarkspräparation wurden genau 170 ml dieser Suspension verwendet.

Anschließend wurde diese Zellsuspension auf einen Ficoll / Histopaque – Dichtegradienten (Verhältnis 2:1, Dichte 1,077) geschichtet. [Kalla P et al 1991]

Zur Herstellung des Dichtegradienten wurden 56 ml Ficoll (Fa.Seromed) und 28 ml Histopaque (Fa.Sigma) gemischt. Dieser Dichtegradient wurde dann zu gleichen Anteilen auf 20 kleine Zentrifugenröhrchen (Volumen: 20 ml) von je 4 ml verteilt.

Die gewonnene Suspension wurde nun in gleichen Portionen von 8 ml auf den Dichtegradienten pipettiert, so dass eine scharfe Grenze zwischen beiden Phasen erhalten blieb.



**Abb.6:** Darstellung der Interphase (Pfeil) nach dem Zentrifugieren;

Die kleinen Zentrifugenröhrchen wurden nun 20 Minuten bei 700 g und 10° Celsius ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde die Interphase (entspricht der weißen Zellreihe; siehe Abbildung 6) abpipettiert und von 5 kleinen Zentrifugenröhrchen auf ein großes Zentrifugenröhrchen (Volumen: 50 ml) gegeben. Diese großen Zentrifugenröhrchen wurden mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und danach 10 Minuten bei 700g und 20° Celsius erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt.

Zum Schluss wurde erneut der Überstand entfernt, mit „Iscoves modified Dulbeccos“ Medium (IMDM) auf 50 ml aufgefüllt und ein letztes Mal 10 Minuten bei 700 g und 20° Celsius zentrifugiert.

Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellpellets aus den 4 großen Zentrifugenröhrchen in jeweils 12,5 ml aufgenommen und in einen sterilen Behälter überführt.

Die durchschnittliche Zellzahl pro ml wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer und dem Casy-System (Fa. Schärfe) ermittelt und abgeglichen.

### ***4.1.1 Zellkultur-Medium***

IMDM = ISCOVE's modified Dulbecco's Medium [Kalla P et al 1991]

Zusammensetzung für 500 ml IMDM:

- 5 ml L-Glutamin (292,3 ng /ml)
- 0,5 ml Certomycin 100
- 30 ml NaHCO<sub>3</sub> 5%
- 8,85 g ISCOVE's
- 65 ml fetales Kälberserum (FKS) hitzeinaktiviert, 30 Minuten bei 60° Celsius
- 65 ml Pferdeserum (HS) hitzeinaktiviert, 30 Minuten bei 60° Celsius
- 0,5 ml Hydrocortison einer 5 mmolaren Stammlösung (2,4 ng / ml)
- 370 ml Aqua dest.

Das IMDM hatte eine durchschnittliche Osmolarität von 0,344 osm / ml. Die Osmolarität wurde durch Gefrierpunkterniedrigung bestimmt.



### ***4.1.2 Kulturbedingungen***

Am Tag der Zellgewinnung wurden die Zellen unter einem Lamina-Airflow in „6-well-plates“ ausgesät. Pro „well“ ( $\varnothing$  9,81 cm<sup>2</sup>) wurden  $3,0 \times 10^6$  bis  $3,5 \times 10^6$  Zellen ausgesät. Das entspricht 305.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>. Anschließend wurde jeder „well“ bis auf 2 ml Volumen mit IMDM aufgefüllt, um die Ernährung der Zellen zu gewährleisten.

Die humanen Knochenmarkzellkulturen wurden bei 37° Celsius, 12,5 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und 0 % N<sub>2</sub> zunächst für etwa 1 Woche inkubiert. Das Medium wurde alle zwei Tage durch Austausch des Überstandes und Zugabe von neuem IMDM gewechselt.

Nach einer Woche hatten sich die Zellen (im Mittel:  $3,216 \times 10^6$  Zellen = 327.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>) am Boden der „wells“ abgesetzt.

Am 7.Tag wurden die sterilen Tivanium-Partikel in verschiedenen Konzentrationen ( $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  pro ml Medium) hinzugegeben. Der Mediumwechsel wurde von nun an mit Zugabe von Wachstumsfaktoren begleitet. Zur Stimulation der Zellkultur wurden die rekombinanten Wachstumsfaktoren Interleukin-3 (IL-3) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktor (GM-CSF) mit einer Konzentration von 10 ng / ml Medium (Konzentration der Stammlösung, d.h. 1ml für 40 ml Medium) verwendet. [Kalla P et al 1991, 1992, Wilke et al 1991 a,b, 1992, 1993, 1995, 1998, 1999, 2000]

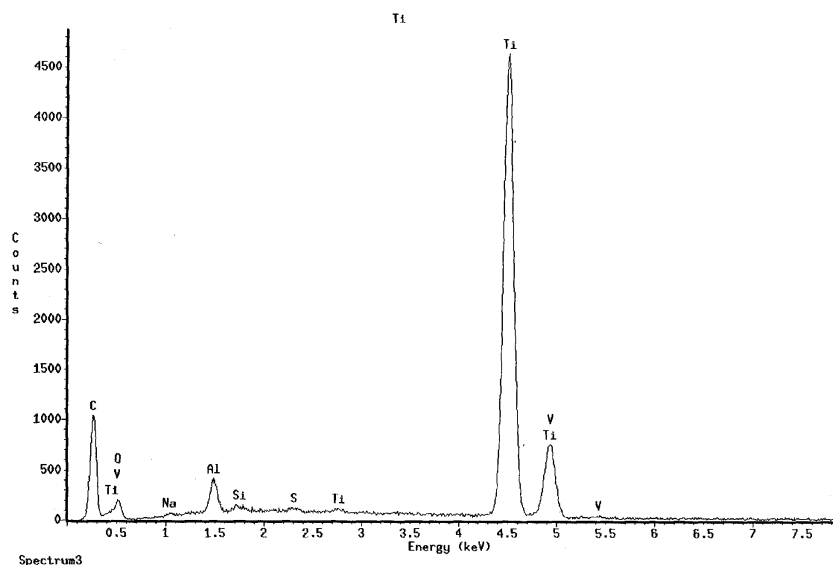
## ***4.2 Materialauswahl***

Die Auswahl von Titan-Aluminium-Vanadium orientiert sich am heutigen Stand der in der Endoprothetik verwendeten Biomaterialien. Die bei der totalen Hüft-Endoprothesen-Operation zum Einsatz kommende Schäfte und Pfannengitter bestehen zum größten Teil aus Titan-Aluminium-Vanadium.

Titan und seine Legierungen sind nach bisherigen Untersuchungen [Semlitsch M 1984, Rae T 1975] als bioinert einzustufen. Es verbindet gute mechanische mit guten biologischen und tribologischen Eigenschaften. [Simon JP 1991, Williams DF 1976]

Daneben zeichnet sich Titan durch seine hohe Festigkeit und sehr gute Korrosionsbeständigkeit aus. Im Gegensatz zu anderen Metallen (Chrom-Kobalt) ist es als nicht-allergisierend bekannt. [Park JB 1994]

## 4.2.1 Charakterisierung von Titan-Aluminium-Vanadium



Wed Feb 3 18:39:28 1999

Ti #4 Kugel

Refit \_Na-K" \_Na-K" \_S -K" \_S -K"

Refit \_Si-K" \_V -K"

Filter Fit Method

Chi-sqd = 2.92 Livetime = 100.0 Sec.

Standardless Analysis

Element	Relative k-ratio	Error (1-Sigma)	Net Counts	Error (1-Sigma)
C -K	---	---	7407 +/-	81
O -K	0.04562 +/-	0.00197	1321 +/-	57
Na-K	0.00172 +/-	0.00032	175 +/-	32
Al-K	0.02225 +/-	0.00073	2682 +/-	95
Si-K	0.00469 +/-	0.00077	604 +/-	99
S -K	0.00319 +/-	0.00053	387 +/-	64
Ti-K	0.89737 +/-	0.00547	65251 +/-	402
V -K	0.03515 +/-	0.00183	2270 +/-	118

Adjustment Factors

	K	L	M
Z-Balance:	0.00000	0.00000	0.00000
Shell:	1.00000	1.00000	1.00000

PROZA Correction Acc.Volt.= 25 kV Take-off Angle=28.32 deg  
Number of Iterations = 6

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element	Mt % (1-Sigma)	Err.	No. of Cations
O -K	0.0285	11.349	57.50	32.38	+/-	1.40	---
Na-K	0.0011	6.070	0.81	0.05	+/-	0.12	0.338
Al-K	0.0139	2.688	3.34	3.74	+/-	0.12	1.643
Si-K	0.0029	2.048	0.61	0.60	+/-	0.10	0.253
S -K	0.0020	1.353	0.24	0.27	+/-	0.04	0.100
Ti-K	0.5548	1.081	35.57	59.96	+/-	0.37	14.846
V -K	0.0220	1.093	1.34	2.40	+/-	0.12	0.559
Total			100.00	100.00			17.740

**Abb.7:** zeigt eine Materialanalyse der Partikel mit Hilfe der Röntgenspektroskopie; signifikante Verunreinigungen konnten ausgeschlossen werden.

- Bei den Titan-Aluminium-Vanadium Partikel handelt es sich um kommerzielles Tivanium der Firma Zimmer (Warsaw, Indiana (USA)).
- Die Größe der Abriebpartikel wurde mit einer Größe von im Durchschnitt kleiner als 1µm im Durchmesser laut Hersteller angegeben.
- Die chemische Zusammensetzung der Abriebpartikel ist wie folgt:

- Titan:	59,96 %
- Aluminium:	3,74 %
- Vanadium:	2,40 %
- Sauerstoff:	32,38 %
- Natrium:	0,65 %
- Silikon:	0,60 %
- Schwefel:	0,27 %
- Die Sterilisation der Tivaniumabriebpartikel erfolgte bei 134° Celsius im Autoklaven für 30 min.

### ***4.3 Rasterelektronenmikroskopie***

Die für die Rasterelektronenmikroskopie vorgesehenen Abriebpartikel und die mit Abriebpartikeln versetzten humanen Knochenmarkzellkulturen wurden mit ITO-Fixans (2 % Glutaraldehyd Fa. Serva) in 0,1M Cacodylatpuffer (Fa. Serva) (pH 7,4) eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert.

Danach wurde drei Mal mit 0,1M Cacodylat-Puffer für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur gespült.

Anschließend wurde eine Sekundärfixation mit 2 % Osmiumtetroxid (Fa. Degussa) in 0,1M Cacodylat-Puffer für die Dauer von einer Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Daran schloss sich ein abschließendes dreimaliges Spülen mit 0,1M Cacodylatpuffer für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur an.

Hiernach erfolgte die Entwässerung mittels einer aufsteigenden Acetonreihe für jeweils 10 Minuten (50%, 75%, 90%, 95%, 100%igem Aceton) bei Raumtemperatur.

Nach Trocknung der Proben in der Critical-Point-Kammer (Fa. Balzers) erfolgte die Goldbedampfung der Proben mit Hilfe des Sputter-Verfahrens.

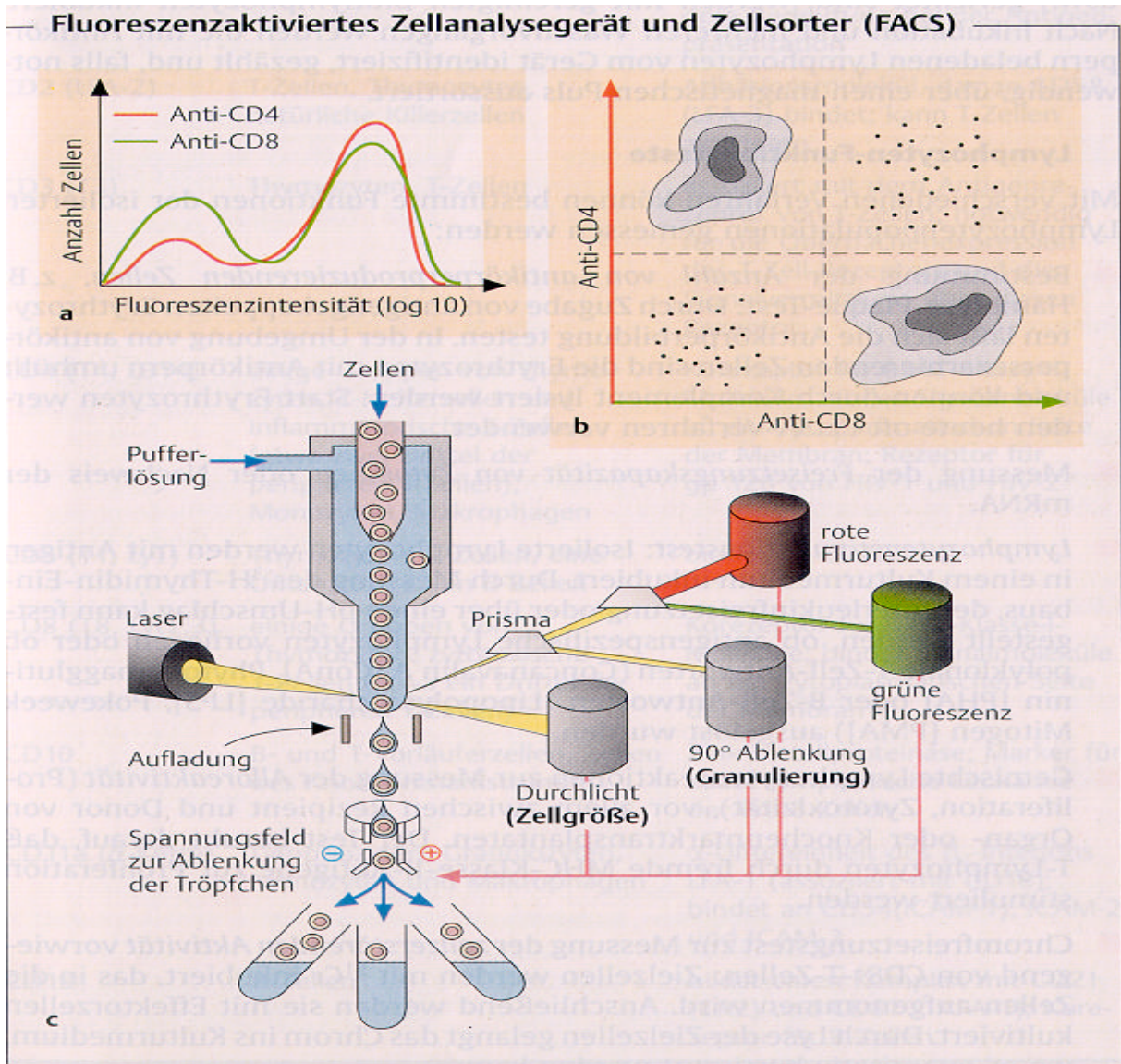
Die mikroskopische Untersuchung erfolgte im Rasterelektronenmikroskop (Mikroskop SX 30, Fa. ISI, GB).

## ***4.4 Zellzahlbestimmung***

Um die Zellzählung durchführen zu können, wurden die mit Abriebpartikel versetzten humanen Knochenmarkzellkulturen chemisch mit 3 ml Accutase komplett vom Boden der 6-well plates“ abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension gut durchmischt und mittels des Casy-Systems die Zellzahl ermittelt. Die ermittelten Werte entsprechen den Zellzahlen aus 10 Experimenten. Die pro ml ermittelten Zellzahlen müssen somit auf 3 ml bezogen werden um die Zellzahl pro „well“ bzw.  $\text{cm}^2$  zu erhalten.

## 4.5 „Fluorescence activating cell sorter“ (FACS)

Dieses Gerät erlaubt die Analyse von Zellen mittels fluoreszierender Antikörper gegen bestimmte Zelloberflächenantigene.



**Abb.8:** Schemazeichnung einer FACS-Analyse [Kayser FH et al 1998]

Inkubiert man beispielsweise Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen CD-4 bzw. CD-8, ergibt sich die in Abbildung 8 (a) gezeigte Verteilung der Fluoreszenzaktivität.

Abbildung 8 (b) lässt erkennen, dass man mit Anti-CD-4 und Anti-CD-8 unterschiedliche Zellpopulationen markieren kann. So lassen sich die prozentualen Anteile der Subpopulationen an der Gesamtpopulation bestimmen.

Diese Tatsache nutzen auch das Zellanalysegerät und der Zellsorter aus (Abbildung 8 (c)). Durch Vibration wird der Zellstrom in feine Tröpfchen verteilt, die je nach Fluoreszenzanalyse und Sortiervorgabe unmittelbar vor dem Abriss aufgeladen werden. Sie enthalten im Idealfall nur eine Zelle. Mit Hilfe eines Laserstrahls werden verschiedene Parameter dieser Zelle gemessen und das betreffende Tröpfchen sofort durch Ablenkungsplatten in das richtige Gefäß umgeleitet. [Kayser FH et al 1998]

Um die Zelldifferenzierung durchführen zu können, wurden die ohne bzw. mit Abriebpartikel versetzten humanen Knochenmarkzellkulturen chemisch mit 2 ml Accutase© komplett vom Boden der „6-well plates“ abgelöst. Die Zellsuspension von zwei „wells“ wurde dann in ein mit 2 ml IMDM-Medium gefülltes Zentrifugenröhrchen (Volumen: 12 ml) gegeben und für 10 min bei 3000 U / min zentrifugiert. Die Zusammenfassung zweier „wells“ war notwendig um ausreichend hohe Zellzahlen für die FACS-Analyse zu erhalten. Anschließend wurde das Zellpellet dreimal mit TBS / BSA - Puffer ( Triphosphate buffered saline = TBS; bovine serum albumine = BSA) gewaschen und jedes Mal für 10 min bei 2000 U / min zentrifugiert.

Danach erfolgte die immunhistochemische Inkubation mit dem direkt FITC-konjugierten Antikörper gegen die Zelloberflächenantigene CD-2 (T-Zellen / natürliche Killerzellen), CD-14 (Monozyten), CD-66b (Granulozyten), CD-19 (B-Zellen), CD-34 (hämatopoetische Stammzellen). Die CD-Antikörper wurden 1:10 mit TBS / BSA verdünnt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit TBS / BSA gewaschen und jeweils 5 min bei 4000 U / min zentrifugiert (Entfernung aller nicht membrangebundenen Antikörper). Die Zellsuspensionen wurden nach erfolgreicher Inkubation und Spülung zusätzlich mit einem Anti-mouse-Ig-FITC-konjugierten Antikörper in einer 1:10 Verdünnung für 45 min inkubiert. Dieser fluoreszierende Antikörper war gegen die Oberflächenantikörper gerichtet und diente ausschließlich dem indirekten Nachweis der membrangebundenen Oberflächenantigene. Zum Abschluss erfolgte ein zweimaliges Spülen mit TBS / BSA mit jeweils 5 min zentrifugieren bei 4000 U / min um die überschüssigen in Lösung befindlichen



fluoreszierenden Antikörper zu eliminieren. Danach erfolgte die Zelldifferenzierung im „cell sorter“.

### 4.5.1 Zelloberflächenantigene (CD-Antigene)

- CD-2: wird von T-Zellen, Thymozyten und „natural killer cells“ (NKZ) exprimiert. Es ist ein Adhäsionsmolekül, das an CD-58 (LFA-2) bindet und T-Zellen aktivieren kann. CD-2 hat ein Molekulargewicht von 50 kDalton. [Spezifikation Aventis-Behring]
- CD-14: ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 55 kDalton. CD-14 befindet sich vor allem auf der Zelloberfläche von Monozyten. [Spezifikation Aventis-Behring]
- CD66b: wird von Granulozyten/Makrophagen exprimiert und hat ein Molekulargewicht von 55 kDalton. [Knapp W 1990] [Spezifikation Aventis-Behring]
- CD-19: wird von B-Zellen exprimiert. Es ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 95 kDalton. CD-19 bildet zusammen mit CD-21 (CR2) und CD-81 (TAPA-1) einen Komplex. Des weiteren bildet es einen Ko-Rezeptor für B-Zellen. [Spezifikation Aventis-Behring]
- CD-34: ist ein Zelloberflächenantigen, welches von hämatopoetischen Vorläuferzellen und Kapillarendothel exprimiert wird. [Spezifikation Aventis-Behring]

#### Immunfluoreszenz:

- CD-14: Der monoklonale CD-14-Antikörper wurde von der Fa. Behring zur Verfügung gestellt.  
Behring-Code: BMA 0211 FITC  
Produkt-Nummer: NCPI 10/11
- CD-2: Dieser monoklonale Antikörper wurde von der Fa. Behring zur Verfügung gestellt.  
Behring-Code: BMA 0111-FITC  
Spezifität: Pan T-Rezeptor (IgG1), MT 1110  
Produkt-Nummer: NCPE 10/11

CD-19: Dieser monoklonale Antikörper wurde von der Fa. Behring zur Verfügung gestellt.

Behring-Code: BMA 0130-PE

Spezifität: Pan-B-Lymphozyten (IgG1) HD37

Produkt-Nummer: NCPO 10/11

CD-15/CD-66b: Dieser monoklonale Antikörper wurde von der Fa. Behring zur Verfügung gestellt.

Behring-Code: BMA 0200-FITC

Spezifität: Granulozyten/Makrophagen (IgM) VIM-C6

Produkt-Nummer: NCPG 10/11

CD-34: Dieser monoklonale Antikörper wurde von der Fa. Behring zur Verfügung gestellt.

Behring-Code: BMA 0230-FITC

Spezifität: Stammzellen (IgM) VIM-C6

Produkt-Nummer: NCPH 10/11

## 4.6 Statistik (Students-t-Test)

Die Messungen, bezüglich der Zellzahlen und des Zytokinprofils zeigten eine Normalverteilung. Um die Signifikanz der Ergebnisse zu evaluieren wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Dazu wurde der t-Test (Students-t-Test) für unverbundene Stichproben angewandt. Der t-Test wird angewandt, um zwei Stichproben vom Umfang  $n_1$  und  $n_2$ , mit dem Mittelwert  $\bar{x}_1$  und  $\bar{x}_2$  und Standardabweichung  $s_1$  und  $s_2$  miteinander zu vergleichen.

Die Prüfgröße ist:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_{1,2} \times \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{mit} \quad s_{1,2} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times s_1^2 + (n_2 - 1) \times s_2^2}{n_1 - 1 + n_2 - 1}}$$

Die Prüfgröße  $t$  ist als Quotient aus Differenz der Mittelwerte ( $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ ) und dem mittleren Fehler dieser Differenz zu verstehen.

Für die Auswertung spielt die Anzahl der Freiheitsgrade eine Rolle:

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Um die Vorgehensweise zu verdeutlichen, wird auf der folgenden Seite ein Rechenbeispiel aufgeführt.

Um den Einfluß der Wachstumsfaktoren auf die Freisetzung der Mediatoren zu erfassen wurde mit der sogenannten „matched pairs“-Technik gearbeitet. Das bedeutet, dass bei jeder Kultur, die mit Wachstumsfaktoren versetzt war eine identische Kontrollkultur bestand, bei der keine Wachstumsfaktoren zugesetzt wurden. Mit dieser Technik konnte man nachweisen, ob die Stimulationseffekte auch ohne den Zusatz von Wachstumsfaktoren eintreten und nicht nur eine Folge des Zellprimings waren.

Beispiel anhand der Zytokinausschüttung von der mit  $10^9$  Partikel versetzten Kultur gegen die Kontrollkultur:

Tabelle 1:

## Kontrollwerte für Interleukin-6

1. Medium-Wechsel	2. Medium-Wechsel	3. Medium-Wechsel	4. Medium-Wechsel	5. Medium-Wechsel	6. Medium-Wechsel	
353	1699	621	451	306	249	
316	1240	585	507	264	223	
201	1240	422	449	270	210	
380	1940	431	391	269	178	
408	1330	565	461	261	181	
401	1275	571	452	278	257	
343,17 pg/ml	1454 pg/ml	532,5 pg/ml	451,83 pg/ml	274,66 pg/ml	216,33 pg/ml	Mittelwert
70,653	269,32941	77,070855	33,756069	14,985178	30,340658	SW

## 2. Medium-Wechsel

## IL-6 Werte

10 <sup>9</sup> Partikel / ml	10 <sup>8</sup> Partikel / ml	10 <sup>7</sup> Partikel / ml	10 <sup>6</sup> Partikel / ml	
20000	5920	6420	1144	
20000	6180	5200	906	
20000	8600	5980	1006	
20000	6508	3580	1068	
20000	6840	4420	4020	
20000	6642	4280	1368	
20000	4780	3500	1522	
20000	4640	2560	1282	
20000	4480	4520	1076	
19700	9870	4425	1065	
20000	9545	4352	1100	
20000	8650	4100	987	
20000	8200	3620	1096	
20000	4880	2160	1088	
20000	4600	2460	640	
19980 pg/ml	6689 pg/ml	4105,1333 pg/ml	1291,2 pg/ml	Mittelwert
77,45966692	1876,9854	1203,9321	780,88011	SW

Rechenbeispiel:

$x_1$  = Mittelwert IL-6 2.Medium-Wechsel Kontrolle

$x_2$  = Mittelwert IL-6 2.Medium-Wechsel  $10^9$  Partikel / ml

$$n_1 = 6; n_2 = 15; x_1 = 1454; x_2 = 19980; s_1 = 269,32; s_2 = 77,45$$

$$s_{1,2} = \sqrt{\frac{(6-1) \times 269,32^2 + (15-1) \times 77,45^2}{6-1+15-1}}$$

$$s_{1,2} = \sqrt{\frac{362666,312 + 83979,035}{19}}$$

$$s_{1,2} = 142,48$$

$$t = \frac{1454 - 19980}{142,48 \times \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{15}}}$$

$$t = \frac{-18526}{68,39}$$

$$t = 270,88$$

*Freiheitsgrade :*

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

$$v = 19$$

Kritischer Wert für  $\nu = 23$  unter der Wahrscheinlichkeit  $\alpha=0,05$ ,  $\alpha=0,02$ ,  $\alpha=0,01$ ,  $\alpha=0,001$

	$\alpha=0,20$	$\alpha=0,10$	$\alpha=0,05$	$\alpha=0,02$	$\alpha=0,01$	$\alpha=0,001$
$V=15$	1,34	1,75	2,13	2,60	2,95	4,07
$\nu=20$	1,33	1,73	2,09	2,53	2,85	3,85
$\nu=30$	1,31	1,7	2,04	2,46	2,75	3,65

Die Prüfgröße  $t$  ist somit größer als der Wert unter der Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha=0,001$ . Damit ist statistisch hochsignifikant gesichert, dass die Zytokinausschüttung zwischen der Kontrollkultur und der mit Abriebpartikel versetzten Kultur voneinander verschieden sind.

## 4.7 Versuchsmaterialien

- Brutschränke B-560, Heraeus Instruments, Hanau
- PBS, Fa. Seromed, Berlin
- 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon®), Fa. Becton-Dickenson, Lincoln Park USA
- 5ml, 10ml, 25ml Pipetten (Falcon®), Fa. Becton-Dickenson, Lincoln Park
- Iscoves modified Dulbeccos medium (IMDM), Fa. Life Technologies, Eggenstein
- Ficoll®, 1,077, Fa. Seromed, Berlin
- Histopaque®, 1,119, Fa. Sigma Diagnostics, St.Louis, USA
- Pferdeserum, Fa. Hyclone, Logan, USA
- Fetales Kälberserum, Fa. Life Technologies, Eggenstein
- Certomycin®, Fa. Essex Pharma, München
- NaHCO<sub>3</sub>, Fa. Merck, Darmstadt
- Hydrocortison, Fa. Sigma Diagnostics, St.Louis, USA
- Interleukin-3 (IL-3), Fa. Behring-Aventis, Marburg
- Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GMCSF), Fa. Behring-Aventis, Marburg
- L-Glutamin, Fa. Flow Laboratories, GB
- Critical Point Kammer, Fa. Balzers Liechtenstein
- Sputter coater S150, Fa. Edwards, West Sussex, GB
- Durchlichtmikroskop IMT2, Fa. Olympus, Tokio, Japan
- Rasterelektronenmikroskop ISI SX 30, Fa. ISI, GB
- Bovines serum albumine (BSA), Fa. SERVA, Heidelberg
- Glutaraldehyd, Fa. SERVA, Heidelberg
- TBS, Fa. Merck, Darmstadt
- Tris-Puffer, Fa. Sigma Diagnostics, St.Louis, USA
- Zentrifuge, Fa. Beckmann, J2-21 M/E, USA
- Aceton, Fa. Merck, Darmstadt
- CD2-Ak, Fa. Behring-Aventis, Marburg



- CD14-Ak, Fa. Behring- Aventis, Marburg
- CD15-Ak, Fa. Behring- Aventis, Marburg
- CD19-Ak, Fa. Behring- Aventis, Marburg
- CD34-Ak, Fa. Behring- Aventis, Marburg
- Ethanol, Fa. Merck, Darmstadt
- Formaldehyd, Fa. Merck, Darmstadt
- FACS, Fa. Becton-Dickenson, USA
- Casy System (Zellzähler), Fa. Schärfe, Reutlingen
- Accutase, Fa. PAA, Marburg

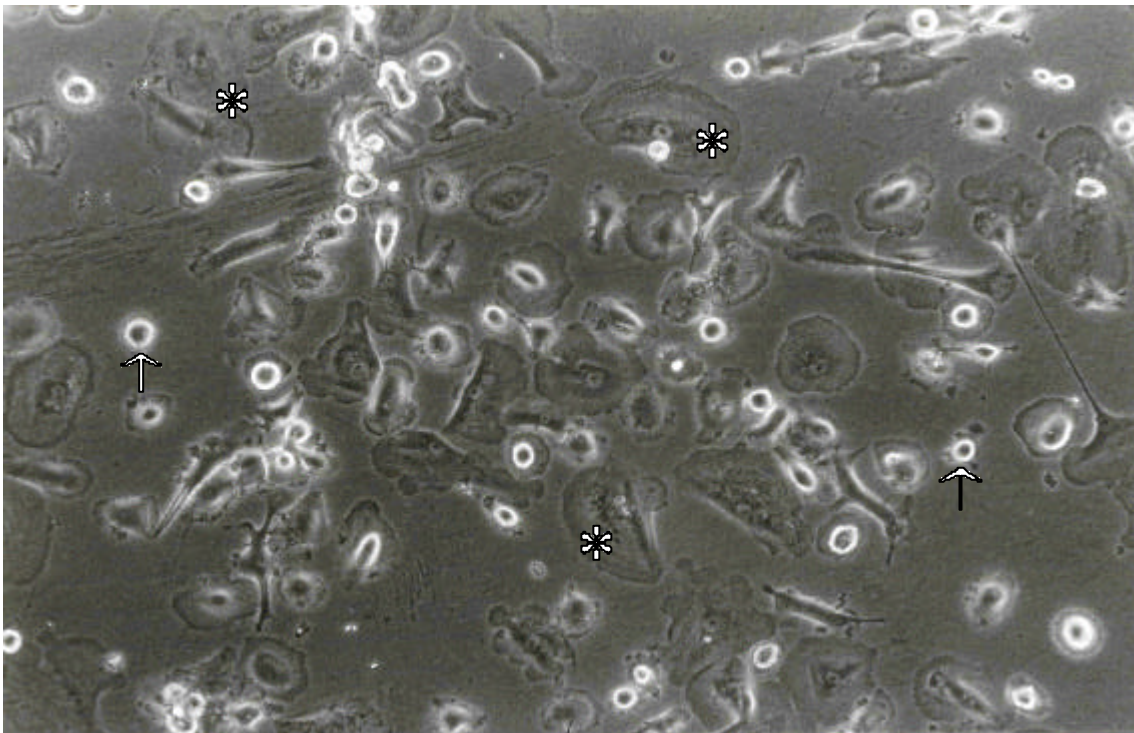
## ***V. Ergebnisse***

### ***5.1 Zellkultur ohne Tivaniumabriebpartikel (Kontrolle)***

Die humanen Knochenmarkzellkulturen zeigten während der 21-tägigen Kulturdauer ein gutes Proliferationsverhalten und bildeten nach den 3 Wochen einen dichten Zellrasen. Anhand eines FACS („fluorescence activating cell sorter“) wurden die Zellen differenziert sowie vitale Zellen von toten Zellen abgegrenzt.

Gleichzeitig wurde an den Tagen 1,3,6,8,10,14 eine Zellzählung mit Hilfe des Casy-System durchgeführt, um die Ergebnisse der FACS-Analyse mit den Zellzahlen korrelieren zu können.

Das Zytokinprofil der Kontrollkultur wurde an den Tagen 1,3,6,8,10,14 anhand eines Festphasenchemiiluminiszenz-ELISA ermittelt.



**Abb.9:** Lichtmikroskopische Kontrolle der humanen Knochenmarkzellkultur im Plastikwell bei 10-facher Vergrößerung; \*  $\equiv$  adhärenente Zellen;  $\rightarrow$   $\equiv$  nicht-adhärenente Zellen; Kulturdauer: 7 Tage

### ***5.1.1 Kontrolle von Zelloberflächenantigenen (Zelldifferenzierung)***

Die Kontrollen der humanen Knochenmarkzellkultur bezüglich der Zelldifferenzierung wurden bereits in vorhergehenden Studien mehrfach in unserem Labor durchgeführt.

Als Untersuchungszeitpunkt wurde zum einen der Tag der Knochenmarkpräparation gewählt. Somit war die Zusammensetzung der humanen Knochenmarkzellkultur am Tag 0 bekannt. Zum anderen wurde die humane Knochenmarkzellkultur nach dreiwöchiger Kulturdauer bezüglich ihrer Zusammensetzung untersucht.

Innerhalb der dreiwöchigen Kulturdauer konnten keine signifikanten Veränderungen der Zusammensetzung in der humanen Knochenmarkzellkultur gefunden werden.

[Wilke et al 1993, 1994, 1997]

## 5.1.2 Zytokinprofil bei verschiedenen Zellzahlen ohne Partikelzusatz

Tabelle 3:

Zellzahl Kontrollwerte für Interleukin-6

	1. Wechsel	2. Wechsel	3. Wechsel	4. Wechsel	5. Wechsel	6. Wechsel
750.000 pro well	189 pg/ml	345 pg/ml	338 pg/ml	512 pg/ml	496 pg/ml	258 pg/ml
750.000 pro well	169 pg/ml	275 pg/ml	376 pg/ml	435 pg/ml	544 pg/ml	409 pg/ml
1,5 Mio pro well	288 pg/ml	631 pg/ml	686 pg/ml	606 pg/ml	490 pg/ml	352 pg/ml
1,5 Mio pro well	287 pg/ml	721 pg/ml	702 pg/ml	592 pg/ml	571 pg/ml	366 pg/ml
3 Mio pro well	353 pg/ml	1699 pg/ml	621 pg/ml	451 pg/ml	306 pg/ml	249 pg/ml
3 Mio pro well	316 pg/ml	1240 pg/ml	585 pg/ml	507 pg/ml	264 pg/ml	223 pg/ml
4,5 Mio pro well	402 pg/ml	1131 pg/ml	615 pg/ml	373 pg/ml	251 pg/ml	278 pg/ml

Interleukin-6 Expression bei verschiedenen Zellzahlen

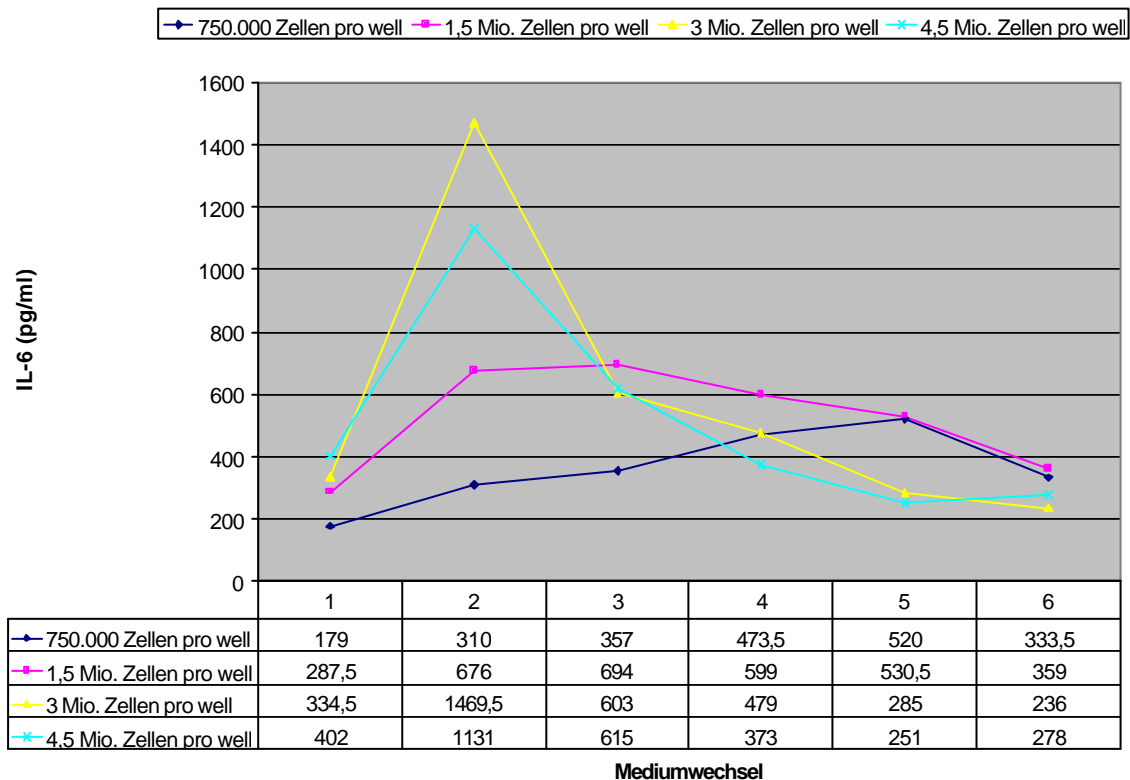
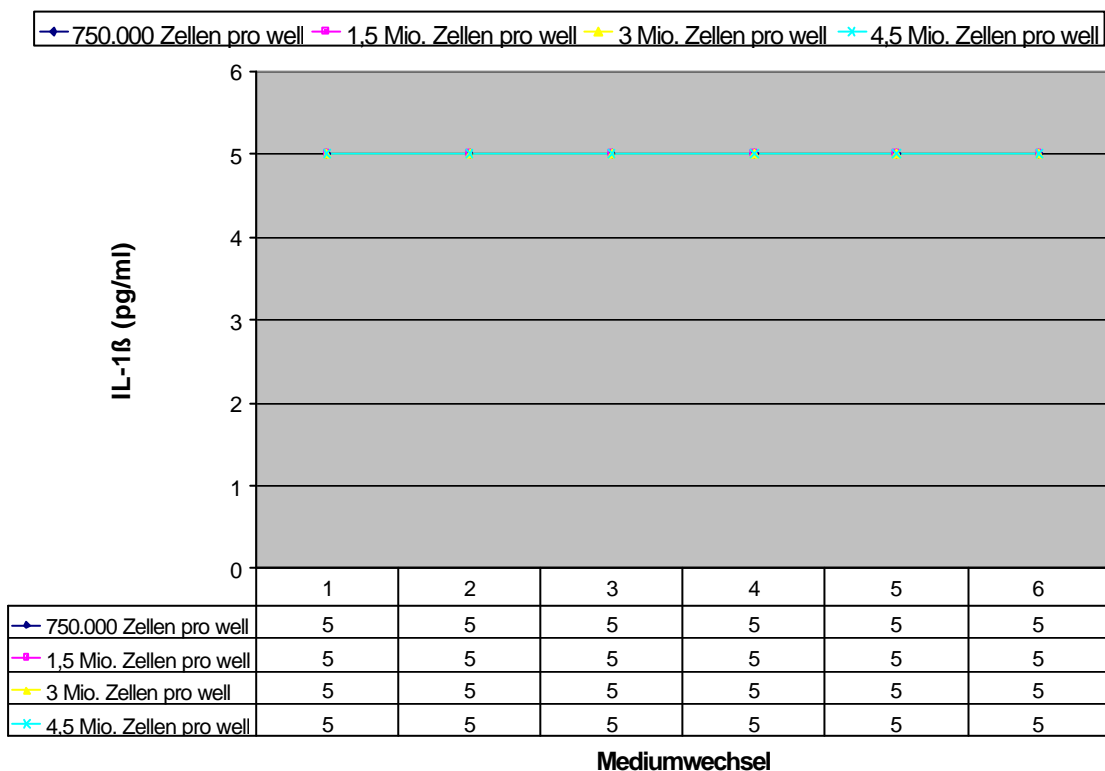


Abb.10: Interleukin-6 Freisetzung bei verschiedenen Zellzahlen.

Tabelle 4:

Zellzahl Kontrollwerte für Interlukin-1 $\beta$ 

	1. Wechsel	2. Wechsel	3. Wechsel	4. Wechsel	5. Wechsel	6. Wechsel
750.000 pro well	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml
750.000 pro well	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml
1,5 Mio pro well	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml
1,5 Mio pro well	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml
3 Mio pro well	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml
3 Mio pro well	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml
4,5 Mio pro well	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml	5 pg/ml

Interleukin-1 $\beta$  Expression bei verschiedenen Zellzahlen

**Abb.11:** Interleukin-1 $\beta$  Freisetzung bei verschiedenen Zellzahlen; wobei 5 pg /ml den kleinsten messbaren Wert darstellt.

Tabelle 5:

Zellzahl      Kontrollwerte für TNF-a

	1. Wechsel	2. Wechsel	3. Wechsel	4. Wechsel	5. Wechsel	6. Wechsel
750.000 pro well	8,3 pg/ml	9,2 pg/ml	7,5 pg/ml	5,4 pg/ml	9,5 pg/ml	7,7 pg/ml
750.000 pro well	9,6 pg/ml	10,8 pg/ml	6 pg/ml	7,7 pg/ml	9 pg/ml	8 pg/ml
1,5 Mio pro well	9,1 pg/ml	11,4 pg/ml	8,7 pg/ml	7 pg/ml	9,6 pg/ml	8,3 pg/ml
1,5 Mio pro well	7,9 pg/ml	9,2 pg/ml	8,4 pg/ml	8,4 pg/ml	9,7 pg/ml	7,8 pg/ml
3 Mio pro well	10,4 pg/ml	10,1 pg/ml	9,9 pg/ml	10,8 pg/ml	9,7 pg/ml	8,3 pg/ml
3 Mio pro well	11,6 pg/ml	9,1 pg/ml	8,6 pg/ml	8,4 pg/ml	8,5 pg/ml	8,1 pg/ml
4,5 Mio pro well	13,7 pg/ml	12 pg/ml	10 pg/ml	10,5 pg/ml	8 pg/ml	9,1 pg/ml

## TNF-alpha Expression bei verschiedenen Zellzahlen

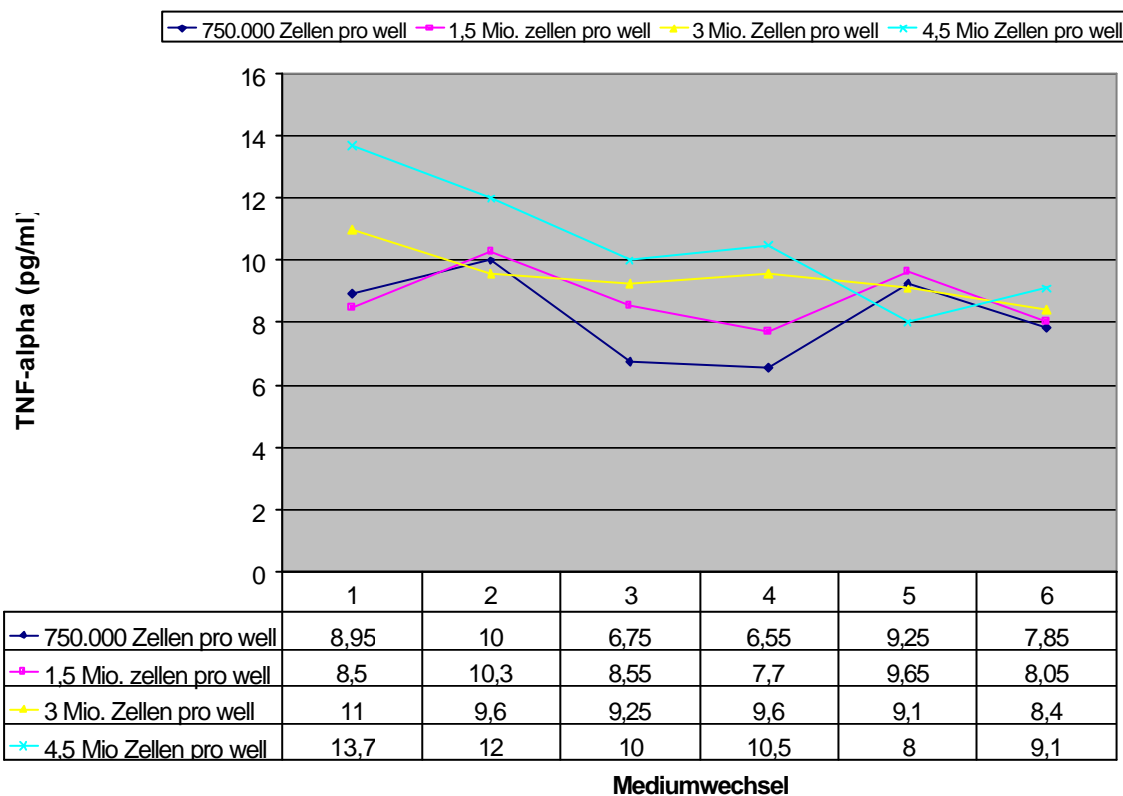


Abb.12: TNF-alpha Freisetzung bei verschiedenen Zellzahlen.

Tabelle 6:

Zellzahl	Kontrollwerte für LDH					
	1. Wechsel	2. Wechsel	3. Wechsel	4. Wechsel	5. Wechsel	6. Wechsel
750.000 pro well	43 U/l	34 U/l	31 U/l	35 U/l	34 U/l	42 U/l
750.000 pro well	39 U/l	33 U/l	31 U/l	34 U/l	37 U/l	44 U/l
1,5 Mio pro well	44 U/l	34 U/l	32 U/l	34 U/l	39 U/l	44 U/l
1,5 Mio pro well	42 U/l	32 U/l	33 U/l	35 U/l	38 U/l	46 U/l
3 Mio pro well	46 U/l	36 U/l	38 U/l	38 U/l	41 U/l	44 U/l
3 Mio pro well	43 U/l	35 U/l	36 U/l	40 U/l	39 U/l	44 U/l
4,5 Mio pro well	49 U/l	38 U/l	37 U/l	39 U/l	39 U/l	43 U/l

LDH Aktivität bei verschiedenen Zellzahlen

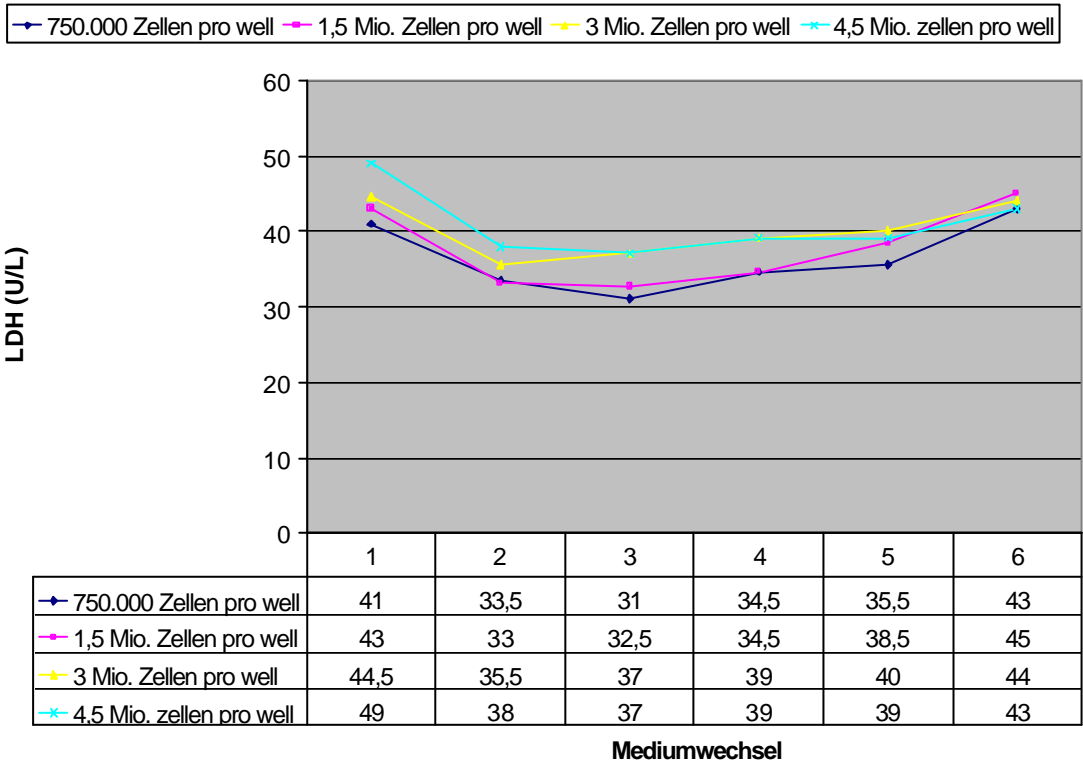


Abb.13: LDH-Aktivität bei verschiedenen Zellzahlen.

**Zusammenfassung der Ergebnisse der Kontrollkulturen:**

Die Negativkontrollen, d.h. humane Knochenmarkzellkulturen ohne Partikelzugabe zeigten bezüglich TNF- $\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$ , trotz unterschiedlicher, Zellzahlen konstant niedrige Werte. Diese betrugen für TNF- $\alpha$  im Mittel 9,07 pg / ml, während die für Interleukin-1 $\beta$  über den gesamten Zeitraum von 14 Tagen unterhalb der Nachweisgrenze von 5 pg / ml lagen.

Die Interleukin-6 Werte zeigten zum einen ein von der Zellzahl abhängiges Zytokinprofil, d.h. je größer die Zelldichte desto größer wird die Zytokinausschüttung, wobei das Maximum in unserer Versuchsanordnung zwischen  $3 \times 10^6$  und  $4,5 \times 10^6$  Zellen zu finden war.

Zum anderen zeigte sich ein deutlicher Anstieg des Interleukin-6 Levels am 3. Tag der Kultur (2.Wechsel), der schließlich wieder auf das Ausgangsniveau abfiel.

Bei der LDH-Aktivität zeigte sich für die verschiedenen Zellzahlen ein gleichmäßig konstant niedriger Level.



### 5.1.3 Zytokinprofil bei 305.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> ohne Partikelzusatz

- Für Interleukin-6 ergab sich folgendes Zytokinprofil:

#### Kontrollwerte für Interleukin-6

1. Wechsel	2. Wechsel	3. Wechsel	4. Wechsel	5. Wechsel	6. Wechsel
353	1699	621	451	306	249
316	1240	585	507	264	223
201	1240	422	449	270	210
380	1940	431	391	269	178
408	1330	565	461	261	181
401	1275	571	452	278	257

343,17 pg/ml	1454 pg/ml	532,5 pg/ml	451,83 pg/ml	274,66pg/ml	216,33 pg/ml	Mittelwert
--------------	------------	-------------	--------------	-------------	--------------	------------

70,65 pg/ml	269,32 pg/ml	77,07 pg/ml	33,75 pg/ml	14,98 pg/ml	30,340 pg/ml	SW
-------------	--------------	-------------	-------------	-------------	--------------	----

#### IL-6 Freisetzung bei 305.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>

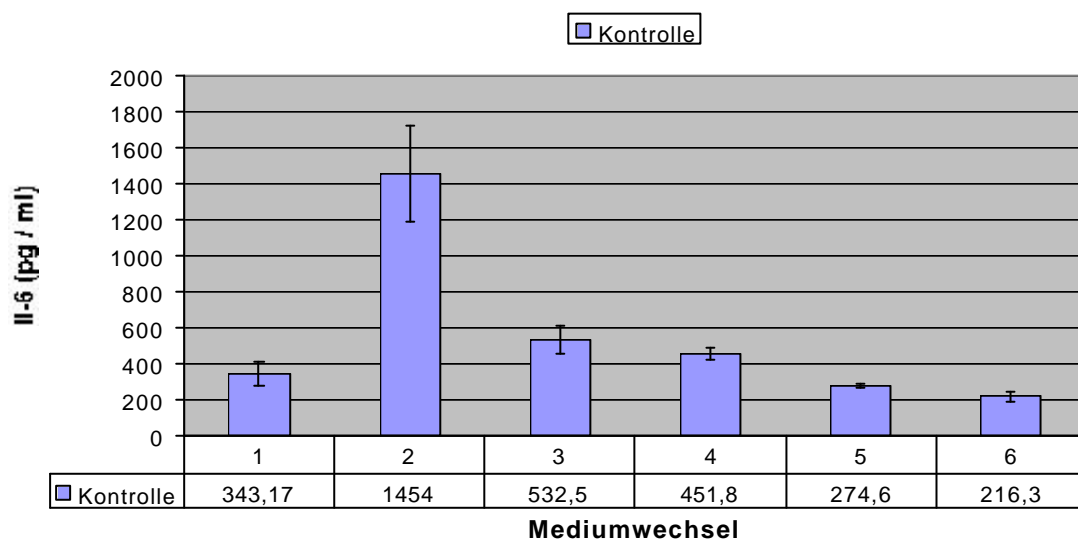


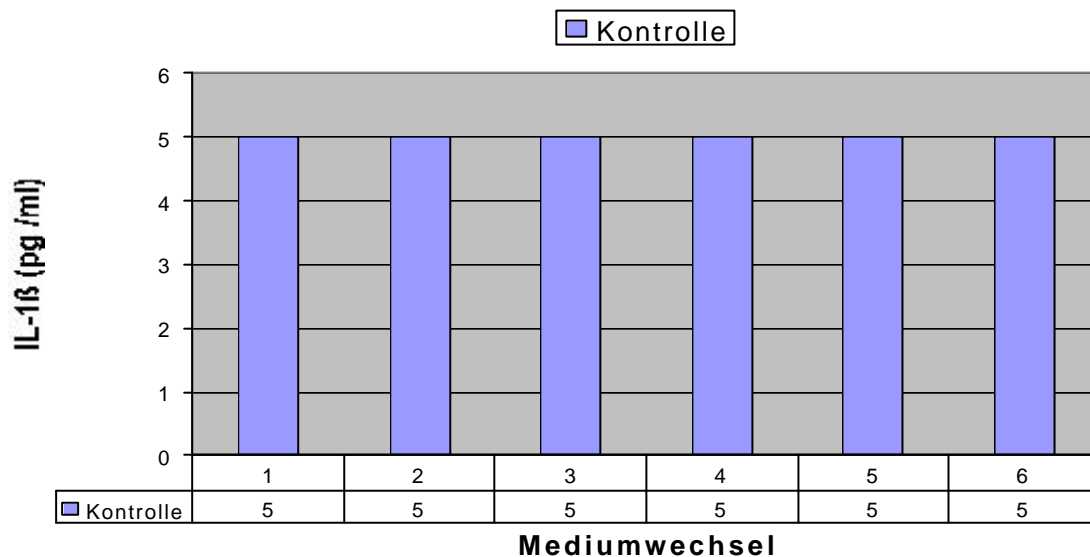
Abb.14: Zytokinprofil von Interleukin-6 in der Negativkontrolle bei 305.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>.

Bei einer Zelldichte von 305.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>, entsprechend unseren Versuchsbedingungen ( $\approx 3 \times 10^6$  Zellen pro 9,81 cm<sup>2</sup> Fläche), zeigte sich im Rahmen der Interleukin-6 Freisetzung ein Anstieg der Werte am 3.Tag der humanen Knochenmarkzellkultur auf ein Maximum von durchschnittlich 1454 pg / ml. Im weiteren Verlauf der Kulturdauer von 14 Tagen fielen die Werte wieder deutlich ab.

- Für Interleukin-1 $\beta$  ergab sich folgendes Zytokinprofil:

Kontrollwerte für Interlukin-1 $\beta$ 

1. Wechsel		2. Wechsel		3. Wechsel		4. Wechsel		5. Wechsel		6. Wechsel	
5		5		5		5		5		5	
5		5		5		5		5		5	
5		5		5		5		5		5	
5		5		5		5		5		5	
5		5		5		5		5		5	
5		5		5		5		5		5	
5 pg/ml		5 pg/ml		5 pg/ml		5 pg/ml		5 pg/ml		5 pg/ml	Mittelwert
0 pg/ml		0 pg/ml		0 pg/ml		0 pg/ml		0 pg/ml		0 pg/ml	SW

IL-1 $\beta$  Freisetzung bei 305.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>

**Abb.15:** Zytokinprofil von Interleukin-1 $\beta$  in der Negativkontrolle bei 305.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>, wobei 5 pg /ml den kleinsten messbaren Wert darstellt.

Bei einer Zelldichte von 305.000 Zellen / cm<sup>2</sup> waren im Rahmen der Interleukin-1 $\beta$  Sekretion die Werte für die gesamte Kulturdauer von 14 Tagen nicht nachweisbar, d.h. sie lagen unter dem Messbereich von 5 pg / ml.

- Für TNF- $\alpha$  ergab sich folgendes Zytokinprofil:

## Kontrollwerte für TNF-a

1. Wechsel    2. Wechsel    3. Wechsel    4. Wechsel    5. Wechsel    6. Wechsel

10,4	10,1	9,9	10,8	9,7	8,3
11,6	9,1	8,6	8,4	8,5	8,1
10,5	10,4	9,9	7,8	10,1	9,8
10,7	11,1	9,4	7,6	10,4	8,5
11	12	10,4	9,8	9,7	8,6
11	9,4	10,1	10	9,8	10

10,86 pg/ml	10,35 pg/ml	9,71 pg/ml	9,06 pg/ml	9,7 pg/ml	8,88 pg/ml	Mittelwert
-------------	-------------	------------	------------	-----------	------------	------------

0,43 pg/ml	1,07 pg/ml	0,63 pg/ml	1,31 pg/ml	0,64 pg/ml	0,80 pg/ml	SW
------------	------------	------------	------------	------------	------------	----

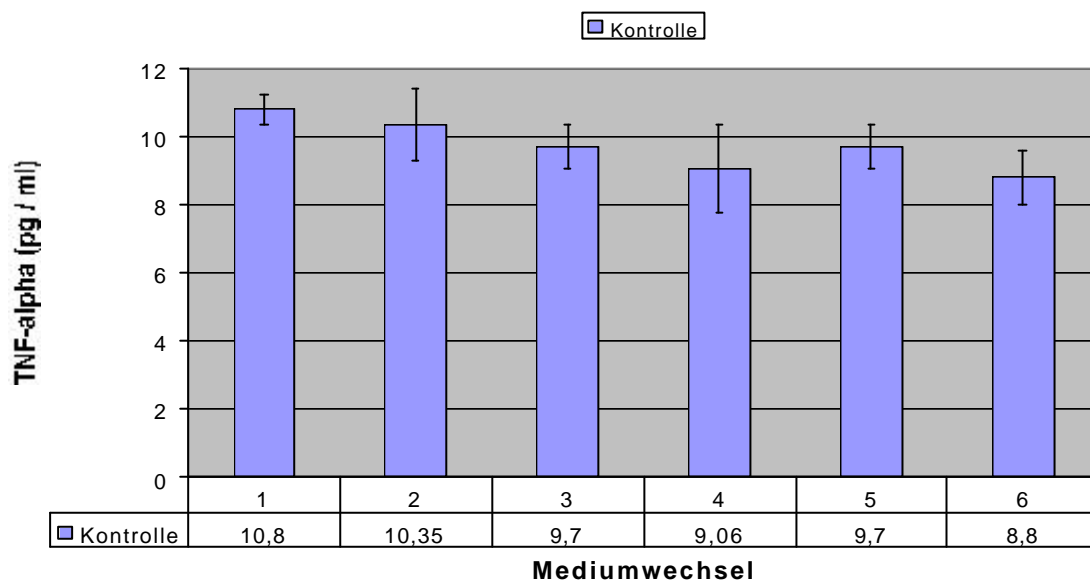
TNF-alpha Freisetzung bei 305.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>

Abb.16: Zytokinprofil von TNF- $\alpha$  in der Negativkontrolle bei 305.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>.

Bezüglich der TNF- $\alpha$  Werte zeigte sich für eine Zelldichte von 305.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> über die gesamte Kulturdauer von 14 Tagen ein konstant niedriger Level der TNF- $\alpha$  Expression.

- Für LDH ergab sich folgendes Profil:

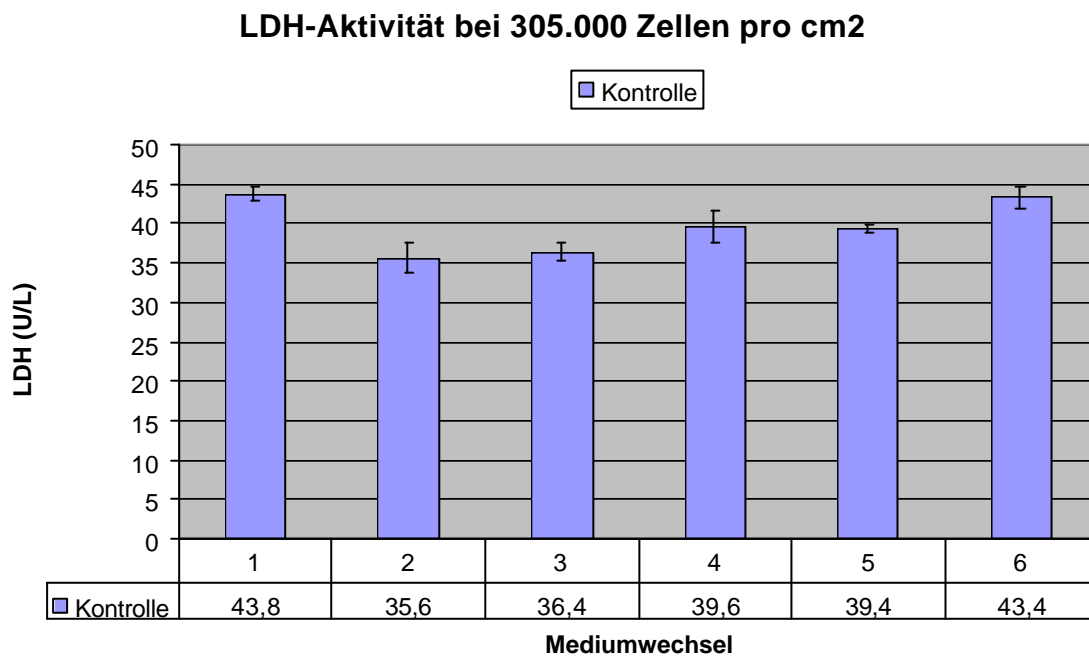
## Kontrollwerte für LDH

1. Wechsel    2. Wechsel    3. Wechsel    4. Wechsel    5. Wechsel    6. Wechsel

46	36	38	38	41	44
43	35	36	40	39	44
44	37	36	41	39	44
43	38	37	42	39	42
45	35	38	38	40	45
44	33	35	37	40	42

43,8 U/l	35,6 U/l	36,4 U/l	39,6 U/l	39,4 U/l	43,4 U/l	Mittelwert
----------	----------	----------	----------	----------	----------	------------

0,83 U/l	1,94 U/l	1,14 U/l	2,07 U/l	0,54 U/l	1,34 U/l	SW
----------	----------	----------	----------	----------	----------	----



**Abb.17:** Aktivität von LDH in der Negativkontrolle bei 305.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>.

Hinsichtlich der LDH-Aktivität bei einer Zelldichte von 305.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>, ließ sich ein konstanter Level über den gesamten Kultur-Zeitraum von 14 Tagen erkennen.

Zytokinprofil bei einer Zelldichte von 305.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>  
(Negativkontrolle)

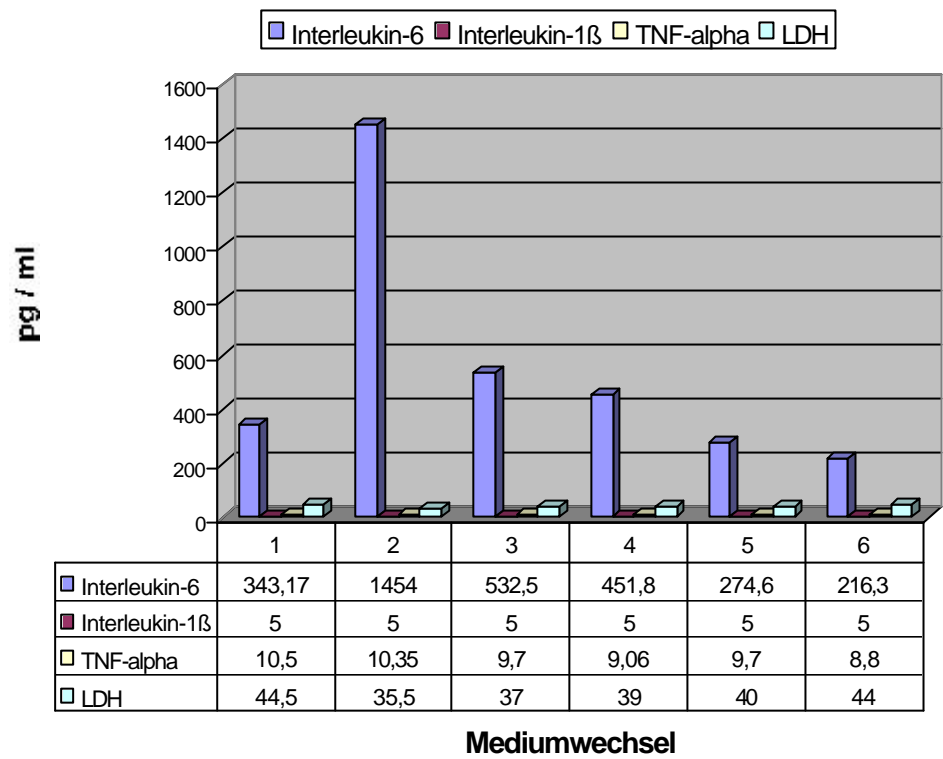


Abb.18: Zusammenfassendes Zytokinprofil der Negativkontrolle bei 305.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>.

## 5.1.4 Einfluß der Wachstumsfaktoren auf die Freisetzung von Mediatoren

Zu diesem Zweck durchgeführte Experimente zeigten bezüglich der Zytokinspiegel, wie auch der LDH-Aktivität, bei der mit Tivanium versetzten humanen Knochenmarkzellkultur, die mit Wachstumsfaktoren versetzt wurden, im Vergleich zu der mit Tivanium versetzten humanen Knochenmarkzellkultur, der keine Wachstumsfaktoren zugesetzt wurden, keinerlei signifikante Veränderungen. Aus Kostengründen wurden hier nur die ersten drei Mediumwechsel untersucht, da innerhalb dieser Zeitspanne der maximale Zytokinanstieg zu beobachten war. In vorangegangenen Studien von Wilke et al [Wilke et al 1998-2000] wurde schon gezeigt, dass die zugegebenen Wachstumsfaktoren keinen Einfluß auf die Zytokinexpression haben.

- **Interleukin-6 Freisetzung**

### 1. Wechsel IL-6 Werte

10\*9 +WF   10\*9 -WF                      10\*8 +WF   10\*8 -WF                      10\*7 +WF   10\*7 -WF                      10\*6 +WF   10\*6 -WF

960	975		988	1330		1112	1100		818	1400
1134	1170		1158	1400		1232	995		898	1220
1292	1400		1180	1120		1038	1400		888	1260

MW	MW		MW	MW		MW	MW		MW	MW
1095,3 pg/ml	1181,6667 pg/ml		1108,6 pg/ml	1283,3333 pg/ml		1127,3 pg/ml	1165 pg/ml		868 pg/ml	1293,3333 pg/ml

### 2. Wechsel IL-6 Werte

10\*9 +WF   10\*9 -WF                      10\*8 +WF   10\*8 -WF                      10\*7 +WF   10\*7 -WF                      10\*6 +WF   10\*6 -WF

10.000	10.000		9870	10.000		6420	5040		1088	982
10.000	10.000		9545	10.000		5200	5530		1096	1130
10.000	10.000		8650	10.000		5980	5180		987	1110

MW	MW		MW	MW		MW	MW		MW	MW
10000 pg/ml	10000 pg/ml		9355 pg/ml	10000 pg/ml		5866,6 pg/ml	5250 pg/ml		1057 pg/ml	1074 pg/ml

## 3. Wechsel IL-6 Werte

10\*9 +WF   10\*9 -WF                      10\*8 +WF   10\*8 -WF                      10\*7 +WF   10\*7 -WF                      10\*6 +WF   10\*6 -WF

10.000	10.000		9940	10.000		2105	2850		805	3290
10.000	10.000		8524	9120		2564	3100		941	3610
10.000	10.000		8940	9980		1804	2700		854	3280

MW	MW		MW	MW		MW	MW		MW	MW
10000 pg/ml	10000 pg/ml		9134,6 pg/ml	9700 pg/ml		2157,6 pg/ml	2883,3333 pg/ml		866,6 pg/ml	3393,3333 pg/ml

- Interleukin-1b -Freisetzung

## 1. Wechsel IL-1b Werte

10\*9 +WF   10\*9 -WF                      10\*8 +WF   10\*8 -WF                      10\*7 +WF   10\*7 -WF                      10\*6 +WF   10\*6 -WF

5	5		5	5		5	5		5	5
5	5		5	5		5	5		5	5
5	5		5	5		5	5		5	5

MW	MW		MW	MW		MW	MW		MW	MW
5 pg/ml	5 pg/ml		5 pg/ml	5 pg/ml		5 pg/ml	5 pg/ml		5 pg/ml	5 pg/ml

## 2. Wechsel IL-1b Werte

10\*9 +WF   10\*9 -WF                      10\*8 +WF   10\*8 -WF                      10\*7 +WF   10\*7 -WF                      10\*6 +WF   10\*6 -WF

588	362		5	5		5	5		5	5
566	427		5	5		5	5		5	5
438	315		5	5		5	5		5	5

MW	MW		MW	MW		MW	MW		MW	MW
530,666 pg/ml	368 pg/ml		5 pg/ml	5 pg/ml		5,5 pg/ml	5 pg/ml		5 pg/ml	5 pg/ml

## 3. Wechsel IL-1b Werte

10\*9 +WF   10\*9 -WF                      10\*8 +WF   10\*8 -WF                      10\*7 +WF   10\*7 -WF                      10\*6 +WF   10\*6 -WF

62,4	75,3		5	5		5	5		5	5
104	45,8		5	5		5	10,5		5	5,2
55,4	50,5		5	5		5	5		5	5
MW	MW		MW	MW		MW	MW		MW	MW
73,9 pg/ml	75,3 pg/ml		5 pg/ml	5 pg/ml		5 pg/ml	6,8 pg/ml		5 pg/ml	5,06 pg/ml

- **TNF-a Freisetzung**

## 1. Wechsel TNF-a Werte

10\*9 +WF   10\*9 -WF                      10\*8 +WF   10\*8 -WF                      10\*7 +WF   10\*7 -WF                      10\*6 +WF   10\*6 -WF

12,1	8,2		10,6	11,4		10,7	11,4		11,7	8,4
11,4	10,2		10	11		11,9	9,6		9,8	7,9
12,6	10,4		12	11		12,6	8,9		7,2	7,8

MW	MW		MW	MW		MW	MW		MW	MW
12,03333	9,6		10,8666667	11,133333		11,7333333	9,9666667		9,56666667	8,0333333
pg/ml	pg/ml		pg/ml	pg/ml		pg/ml	pg/ml		pg/ml	pg/ml

## 2. Wechsel TNF-alpha Werte

10\*9 +WF   10\*9 -WF                      10\*8 +WF   10\*8 -WF                      10\*7 +WF   10\*7 -WF                      10\*6 +WF   10\*6 -WF

78,4	41,4		50,5	38,7		44,7	28,6		25,2	15,5
103	42,3		39,3	37,1		41,7	20,8		32,4	15,4
100	39,8		43	41,2		41,4	22,1		25,2	16,2

MW	MW		MW	MW		MW	MW		MW	MW
93,8	41,166667		44,2666667	39		42,6	23,833333		27,6	15,7
pg/ml	pg/ml		pg/ml	pg/ml		pg/ml	pg/ml		pg/ml	pg/ml

## 3. Wechsel TNF-alpha Werte

10\*9 +WF   10\*9 -WF                      10\*8 +WF   10\*8 -WF                      10\*7 +WF   10\*7 -WF                      10\*6 +WF   10\*6 -WF

35,7	25,4		26,9	20		19,1	11,1		16,5	12,4
30,2	24		11,6	20,7		18,5	12,1		15	11,4
32,9	23,8		11,5	19,5		15,7	12,1		15,6	13,6

MW	MW		MW	MW		MW	MW		MW	MW
32,93333	24,4		16,6666667	20,066667		17,7666667	11,766667		15,7	12,466667
pg/ml	pg/ml		pg/ml	pg/ml		pg/ml	pg/ml		pg/ml	pg/ml



- LDH-Aktivität

## 1. Wechsel LDH Werte

10\*9 +WF   10\*9 -WF                      10\*8 +WF   10\*8 -WF                      10\*7 +WF   10\*7 -WF                      10\*6 +WF   10\*6 -WF

59	53		45	56		48	58		43	55
46	54		52	55		47	60		45	57
45	52		53	56		45	57		53	61

MW	MW		MW	MW		MW	MW		MW	MW
50 U/l	53 U/l		50 U/l	55,666667 U/l		46,6666667 U/l	58,333333 U/l		47 U/l	57,666667 U/l

## 2. Wechsel LDH Werte

10\*9 +WF   10\*9 -WF                      10\*8 +WF   10\*8 -WF                      10\*7 +WF   10\*7 -WF                      10\*6 +WF   10\*6 -WF

85	55		33	28		37	31		32	30
157	169		32	32		34	31		33	28
170	95		37	31		30	32		38	33

MW	MW		MW	MW		MW	MW		MW	MW
137,3333 U/l	106,33333 U/l		34 U/l	30,333333 U/l		33,6666667 U/l	31,333333 U/l		34,3333333 U/l	30,333333 U/l

## 3. Wechsel LDH Werte

10\*9 +WF   10\*9 -WF                      10\*8 +WF   10\*8 -WF                      10\*7 +WF   10\*7 -WF                      10\*6 +WF   10\*6 -WF

225	262		41	45		42	55		65	48
193	160		38	47		37	51		39	50
227	173		47	49		46	49		78	48

MW	MW		MW	MW		MW	MW		MW	MW
215 U/l	198,33333 U/l		42 U/l	47 U/l		41,6666667 U/l	51,666667 U/l		60,6666667 U/l	48,666667 U/l

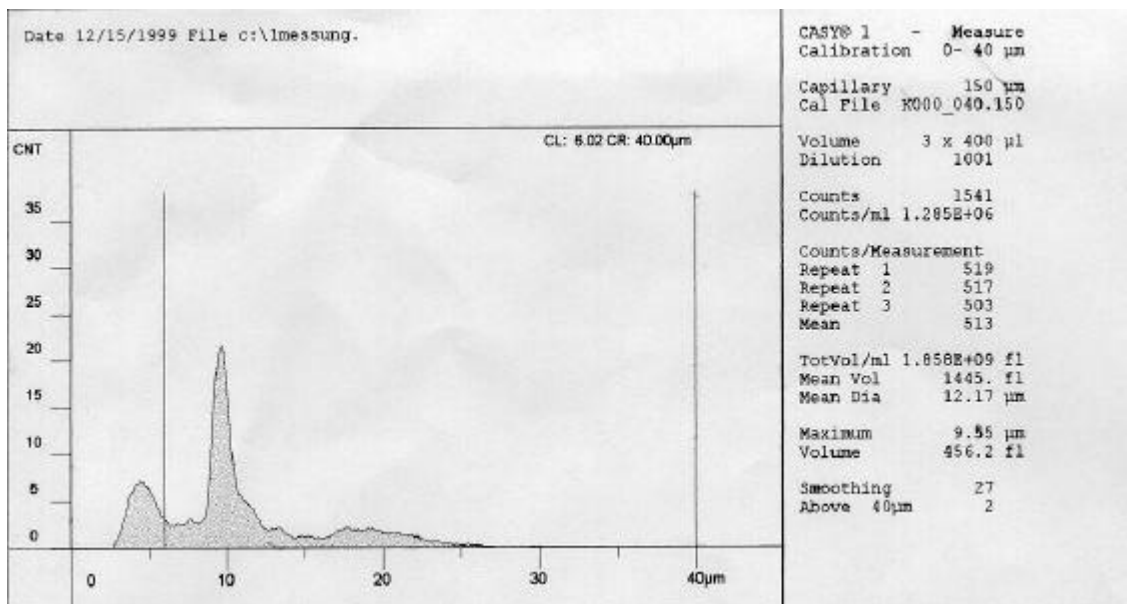
## ***5.2 Humane Knochenmarkzellkultur versetzt mit Tivanium-Abriebpartikeln***

### ***5.2.1 Zellzahlentwicklung der humanen Knochenmark-Zellkultur unter Tivanium-Exposition***

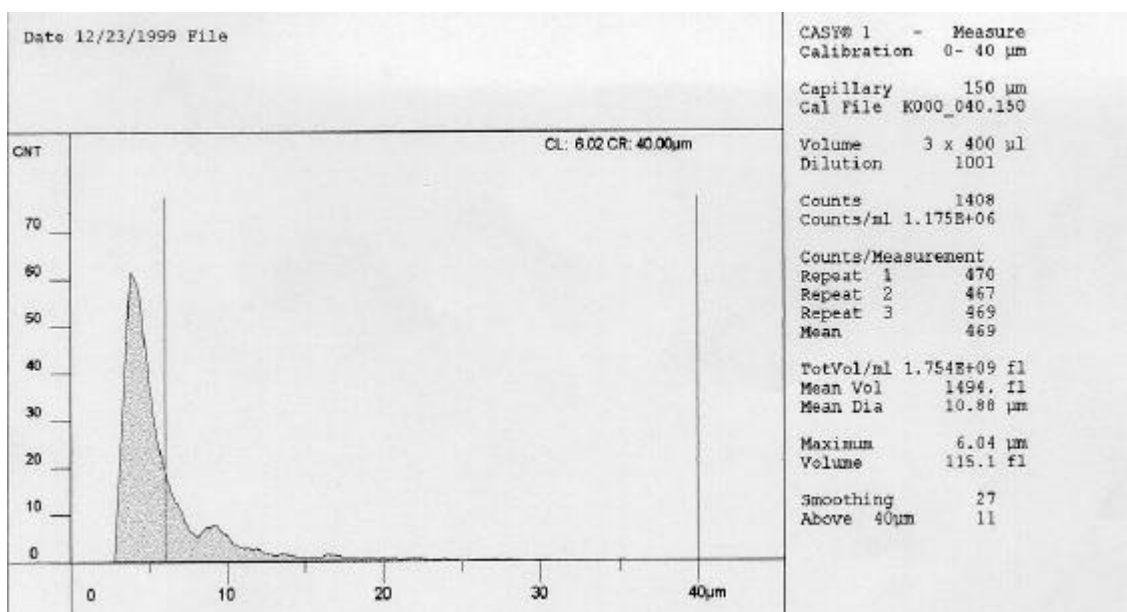
Mit Hilfe des Casy-System wurden die Zellzahlen der 14-tägigen humanen Knochenmarkzellkultur ermittelt. Die Counts entsprechen den Mittelwerten aus 10 Experimenten. Die Zellzahl wurde jeweils am Tag der Knochenmarkpräparation, sowie an den Tagen, an denen der Mediumüberstand zur Analyse des Zytokinprofils gesammelt wurde (Tag 1,3,6,8,10,14) bestimmt.

Zum besseren Vergleich werden anschließend die Grafiken der Zellzahlbestimmungen entsprechend den Tagen 1,3,6,8,10 und 14 für die jeweiligen Partikelkonzentrationen nacheinander aufgelistet. Es wurde ein Messbereich von 6,02 bis 40  $\mu\text{m}$  gewählt, um vitale Zellen von Zellresten abgrenzen zu können. Counts, die unterhalb des Messbereichs von 6,02  $\mu\text{m}$  liegen, entsprechen Zellresten sowie den Tivanium-Partikeln.

- Zellzahlbestimmung für eine mit  $10^9$  Partikel pro ml Medium versetzte humane Knochenmarkzellkultur über den Zeitraum von 2 Wochen:



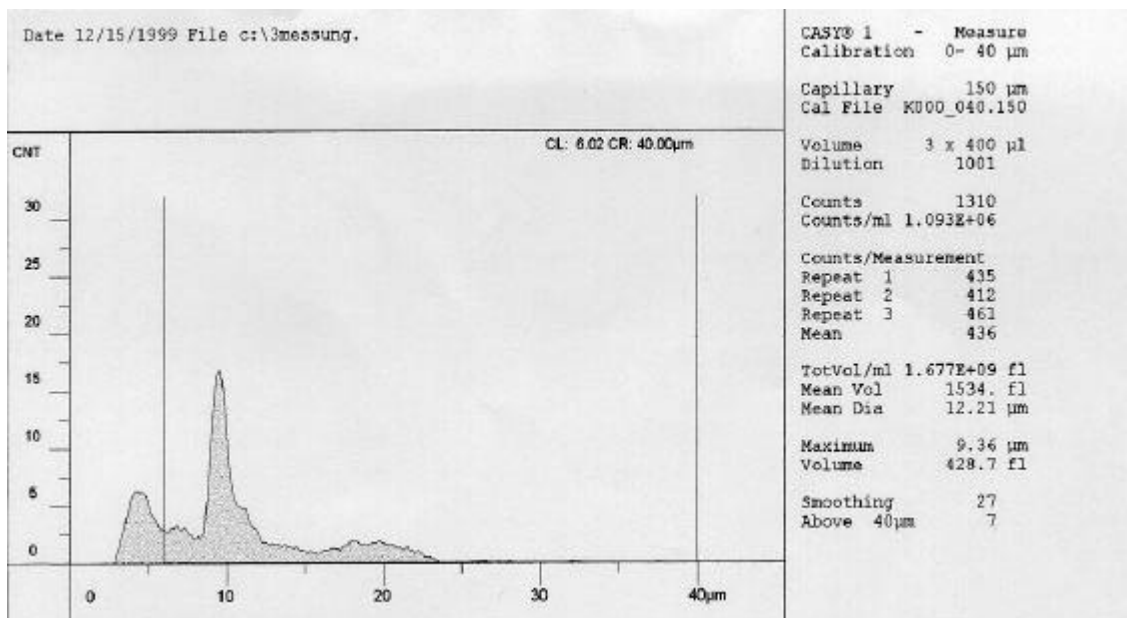
**Abb.19:** Zellzahlmessung mittels Casy-System am Tag 1 (vor Partikelzugabe); die Counts per ml müssen auf 3 ml Medium bezogen werden, d.h.  $1,2 \times 10^6$  Counts per 3 ml = 400.000 Counts per ml.



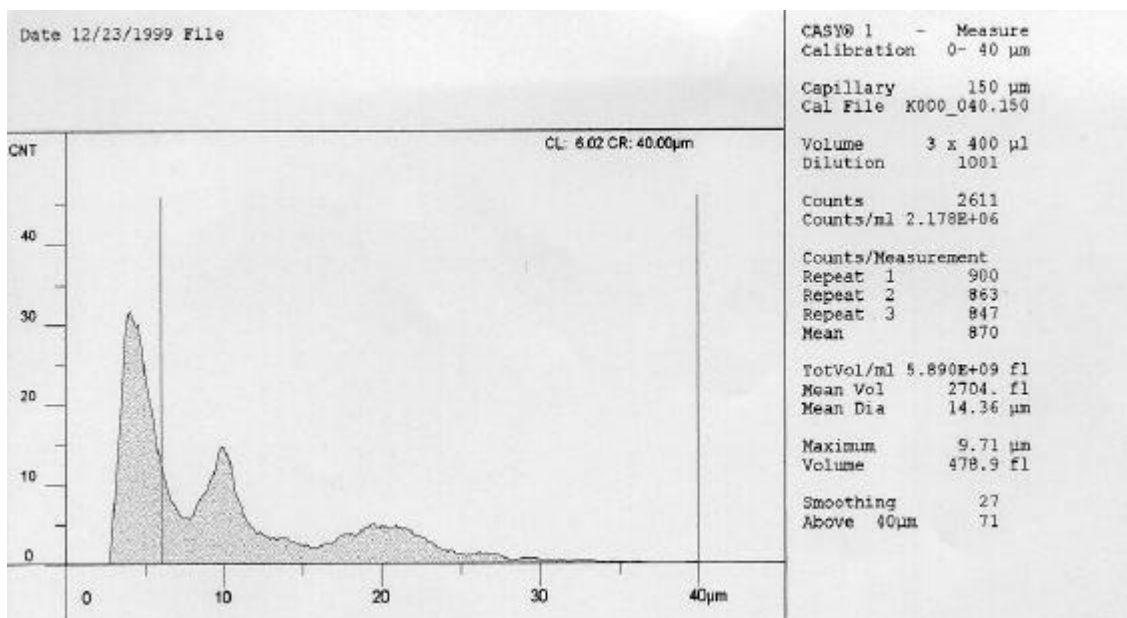
**Abb.20:** Zellzahlmessung mittels Casy-System am Tag 14; die Counts per ml müssen auf 3 ml Medium bezogen werden, d.h.  $1,175 \times 10^6$  Counts per 3 ml = 391000 Counts per ml.

Im Verlauf der mit  $10^9$  Partikeln versetzten humanen Knochenmarkzellkultur zeigte sich innerhalb der zwei Wochen eine deutliche Veränderung des Graphen. Zu Kulturbeginn (vor Partikelzugabe) zeigte sich im Messbereich ( $6.02\ \mu\text{m} - 40\ \mu\text{m}$ ) ein Peak bei  $9,55\ \mu\text{m}$ , der vitalen Zellen entspricht. Nach 14 Tagen ist dieser Peak nicht mehr nachweisbar. Der Peak hat sich in den Bereich unterhalb der  $6.02\ \mu\text{m}$ -Grenze verlagert. Während zu Kulturbeginn 400.000 Counts pro ml ausgezählt wurden, waren nach zwei Wochen unter Zugabe von Wachstumsfaktoren 391.000 Counts pro ml nachweisbar.

- Zellzahlbestimmung für eine mit  $10^8$  Partikel pro ml Medium versetzte humane Knochenmarkzellkultur über den Zeitraum von 2 Wochen:



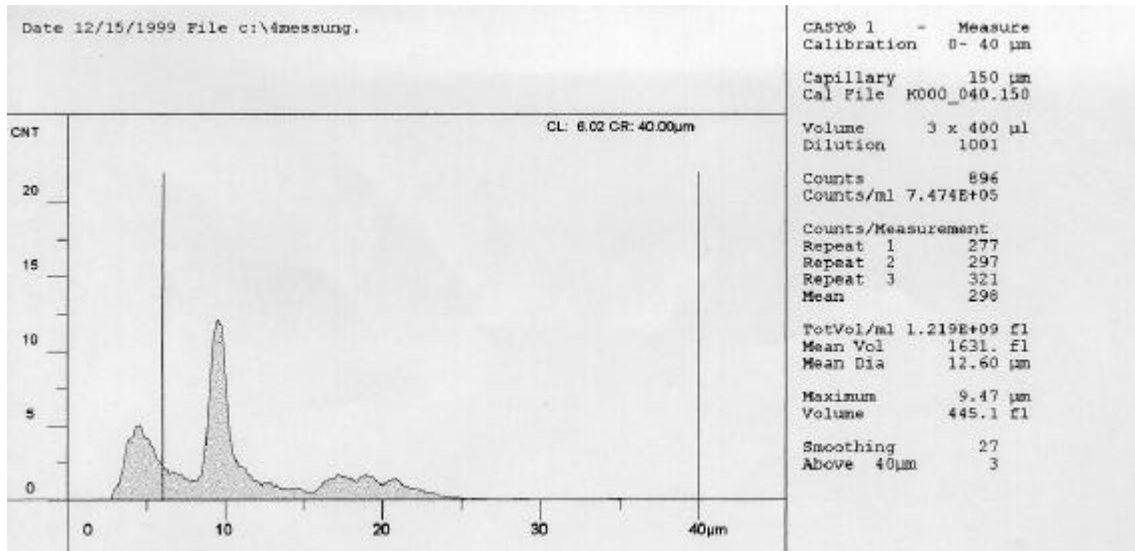
**Abb.21:** Zellzahlmessung mittels Casy-System am Tag 1; die Counts per ml müssen auf 3 ml Medium bezogen werden; d.h.  $1,093 \times 10^6$  Counts per 3 ml = 364000 Counts per ml.



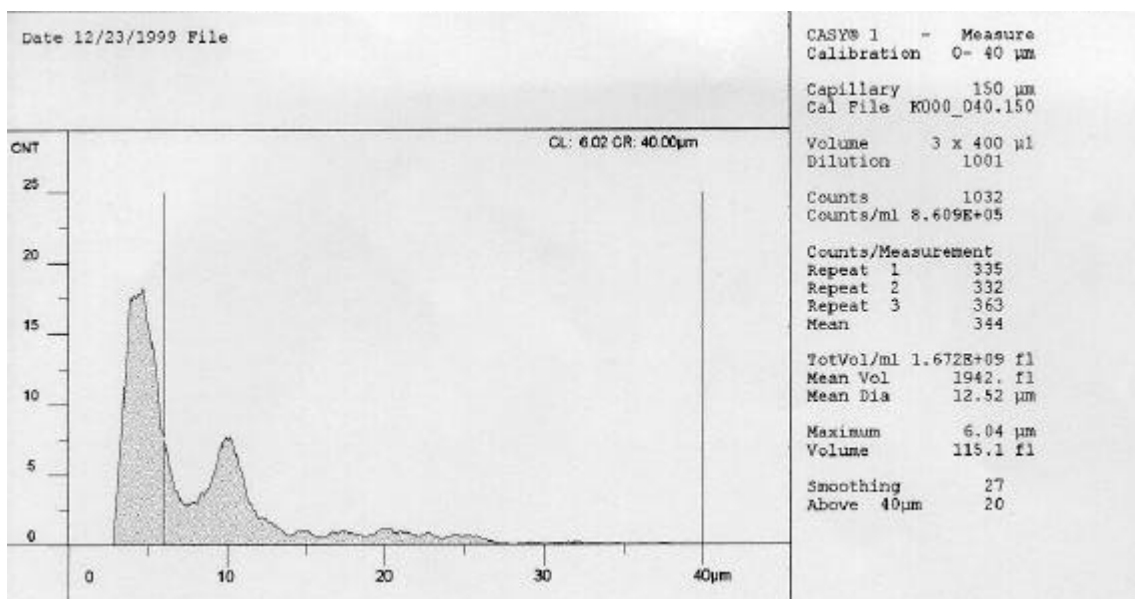
**Abb.22:** Zellzahlmessung mittels Casy-System am Tag 14; die Counts per ml müssen auf 3 ml Medium bezogen werden; d.h.  $2,178 \times 10^6$  Counts per 3 ml = 726000 Counts per ml.

Bei dieser mit  $10^8$  Partikeln pro ml Medium versetzten Kultur zeigt sich im zweiwöchigen Verlauf eine Zunahme der „Counts“ im Bereich um 20  $\mu\text{m}$  und eine Abnahme bei 10  $\mu\text{m}$ . Die Zellzahlbestimmungen lagen zu Beginn bei 364.000 Counts pro ml, der Maximum-Peak lag hier bei 9,36  $\mu\text{m}$ . Nach zwei Wochen lagen die Counts bei 726.000 pro ml mit einer Verlagerung des Maximum-Peak zu 9,71  $\mu\text{m}$ .

- Zellzahlbestimmung für eine mit  $10^7$  Partikel pro ml Medium versetzte humane Knochenmarkzellkultur über den Zeitraum von 2 Wochen:



**Abb.23:** Zellzahlmessung mittels Casy-System am Tag 1; die Counts per ml müssen auf 3 ml Medium bezogen werden; d.h.  $7,474 \times 10^5$  Counts per 3 ml = 249000 Counts per ml.



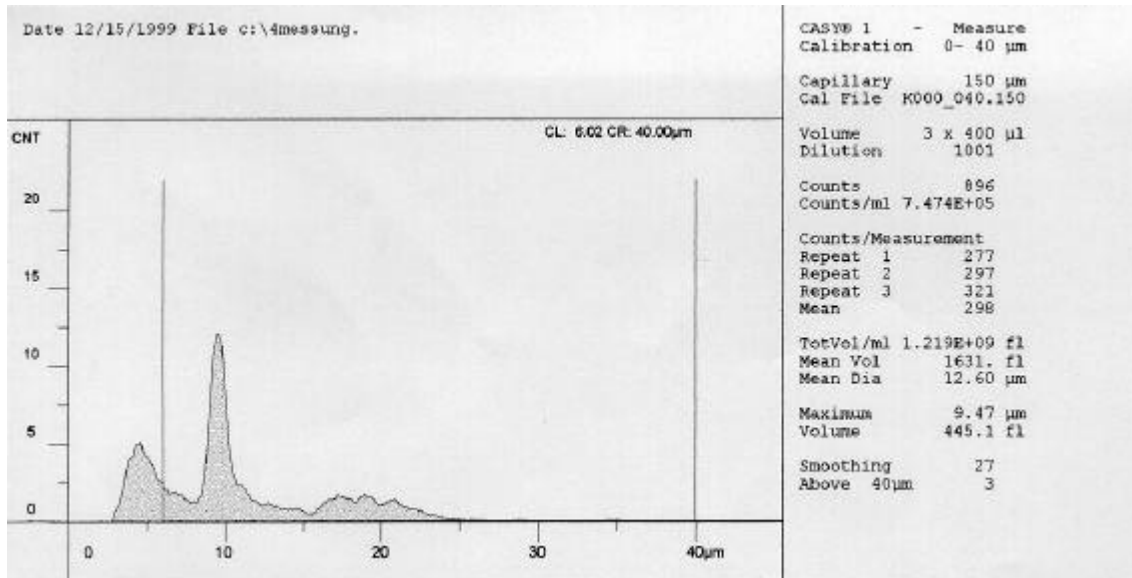
**Abb.24:** Zellzahlmessung mittels Casy-System am Tag 14; die Counts per ml müssen auf 3 ml Medium bezogen werden; d.h.  $8,609 \times 10^5$  Counts per 3ml = 286000 Counts per ml.

In der mit  $10^7$  Partikeln pro ml Medium versetzten Kultur besteht zu Beginn eine Zellzahlbestimmung von 249.000 Counts pro ml. Das Maximum an „Counts“ liegt hier bei etwa 9,47 µm (vitale Zellen). Im weiteren Verlauf kommt es zur Abnahme dieses

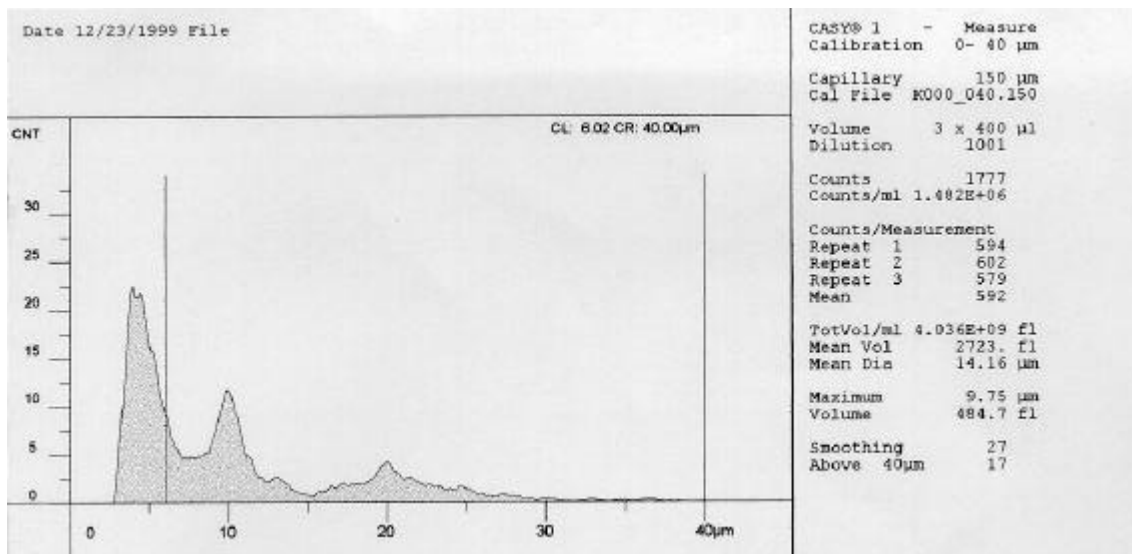
Peaks (Maximum: 6,04  $\mu\text{m}$ ). Bei Kulturende zeigte sich eine Zunahme der „Counts“ bei Werten über 10  $\mu\text{m}$ . Nach zweiwöchiger Kultur beträgt die Zellzahlbestimmung 286.000 Counts pro ml.



- Zellzahlbestimmung für eine mit  $10^6$  Partikel pro ml Medium versetzte humane Knochenmarkzellkultur über den Zeitraum von 2 Wochen:



**Abb.25:** Zellzahlmessung mittels Casy-System am Tag 1; die Counts per ml müssen auf 3 ml Medium bezogen werden; d.h.  $7,474 \times 10^5$  Counts per 3 ml = 249000 Counts per ml.



**Abb.26:** Zellzahlmessung mittels Casy-System am Tag 14; die Counts per ml müssen auf 3 ml Medium bezogen werden;  $1,482 \times 10^6$  Counts per 3 ml = 494000 Counts per ml.

Am Tag 1 der mit  $10^6$  Partikeln pro ml Medium versetzten Kultur betrug die Zellzahlbestimmung 249.000 Counts pro ml. Der Peak befand sich bei ca. 9,47 µm. Nach 14 Tagen in Kultur ließ sich eine Zellzahlbestimmung von 494.000 Counts pro ml

ermitteln. Am Ende der zwei Wochen zeigte sich in dieser Kultur eine Abnahme des zu Beginn vorhandenen Peaks bei 10  $\mu\text{m}$ . Es kam zu einer Zunahme der „Counts“ bei Werten die jenseits dieses Peaks liegen ( $\geq 20\mu\text{m}$ ).

#### ***Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellzahlbestimmung:***

Bei den humanen Knochenmarkzellkulturen, welche mit Partikeln in den Konzentrationen von  $10^8$ ,  $10^7$  und  $10^6$  pro ml Medium versetzt wurden, zeigte sich innerhalb der Kulturdauer eine Abnahme der „Counts“ bei 10  $\mu\text{m}$ . Daneben kam es in diesen Kulturen zu einer Zunahme von „Counts“ bei Werten zwischen 10 und 40  $\mu\text{m}$ . Dies kann an einer Veränderung der Zusammensetzung der humanen Knochenmarkzellkultur liegen oder artefiziell infolge Zellverklebungen entstehen. Insgesamt variierten die Counts in diesen Kulturen stark. In Verbindung mit der LDH-Aktivität (konstante Werte innerhalb der 2 Wochen bei den mit  $10^8$ ,  $10^7$  und  $10^6$  Partikeln pro ml Medium versetzten Kulturen) lässt sich diese Streuung nur durch technische Mängel in der Zellversorgung und Weiterverarbeitung erklären.

In der mit  $10^9$  Partikeln pro ml Medium versetzten humanen Knochenmarkzellkultur kam es zu einer Abnahme der „Counts“ bei 10  $\mu\text{m}$ . Bei den Zellzahlbestimmungen zeigte sich nur eine geringfügige Abnahme der Counts, die aufgrund der großen Streubreite nicht signifikant ist. Allerdings lässt sich unter Berücksichtigung der LDH-Aktivität (signifikante Erhöhung von LDH am 3. und 5. Tag) ein Absterben der Zellen erklären. Dies würde auch die Veränderung der Graphen bestätigen.

### 5.2.2 Zytokinprofil der humanen Knochenmark-Zellkultur unter Tivaniumexposition

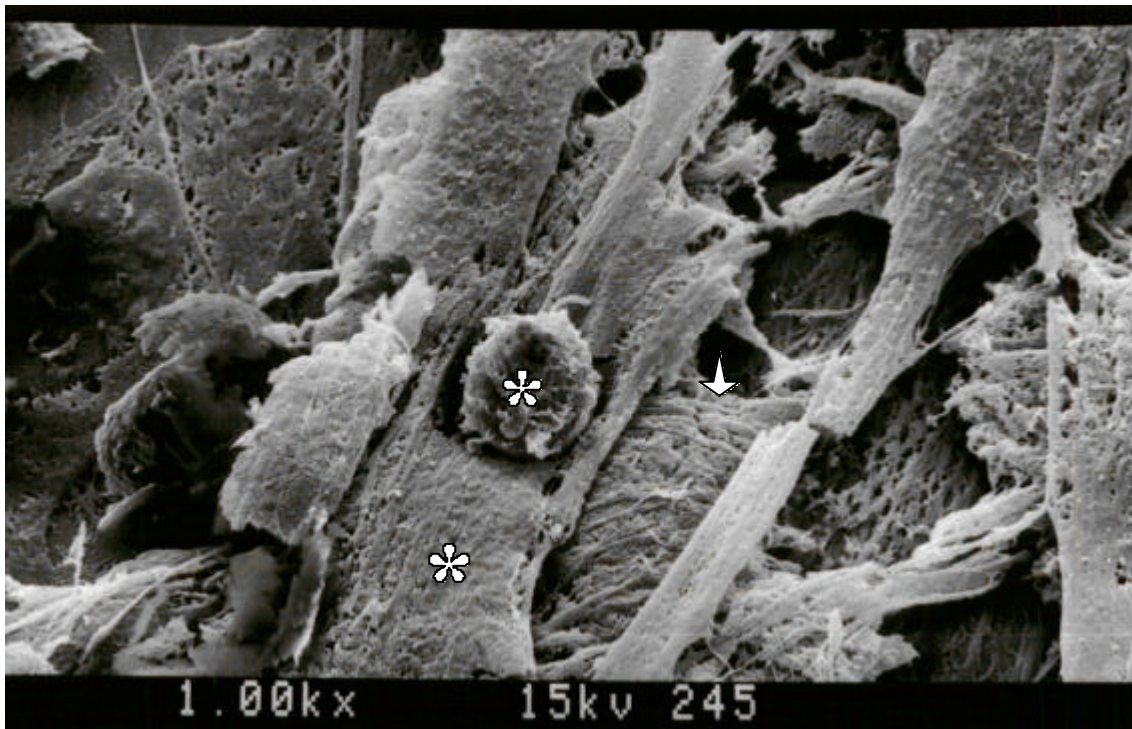
Die Analyse des Zytokinprofils erfolgte durch einen Festphasenchemiiluminiszenz-ELISA.

Es zeigte sich, dass die humane Knochenmarkzellkultur unter Abriebpartikel-Stimulation mit einer konzentrationsabhängigen stark signifikant vermehrten Zytokinexpression für IL-6 und TNF-a reagierte.

Bei IL-1 $\beta$  erfolgte eine signifikant vermehrte Zytokinfreisetzung nur unter der höchsten Partikelkonzentration von 10<sup>9</sup>-Abriebpartikeln pro ml Medium.

Bei LDH, als Marker für die Zelltoxizität der Abriebpartikel, zeigte sich nur in der höchsten Konzentration eine signifikante Erhöhung.

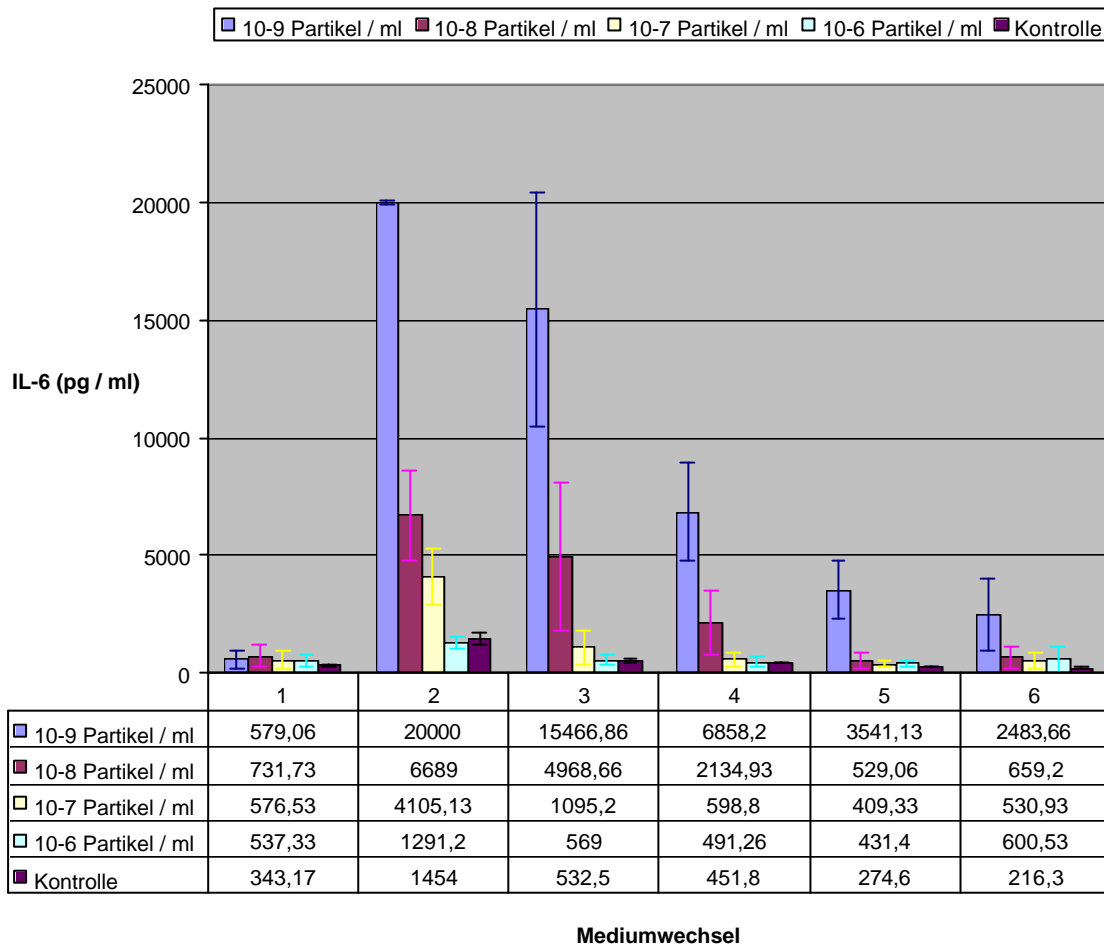
Insgesamt gesehen erwies sich der 3.Tag (2.Wechsel) der Kultur als derjenige, an dem es für die Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF-a zum Maximum der Zytokinausschüttung kam.



**Abb.27:** REM-Bild einer humanen Knochenmarkzellkultur unter Tivaniumexposition bei 1000-facher Vergrößerung; \*  $\equiv$  Partikel der von einer Zelle phagozytiert wird,  $\rightarrow \equiv$  Zellmatrix;

- Für IL-6 ergab sich für die jeweiligen Tage der Mediumwechsel das folgende Zytokinmuster:

### IL-6 Freisetzung nach Titaniumpartikel-Stimulation



**Abb.28:** Zytokinprofil von Interleukin -6 unter Partikelexposition (Konzentration  $10^9, 10^8, 10^7, 10^6$  Partikel pro ml Medium) und in der Negativkontrolle.

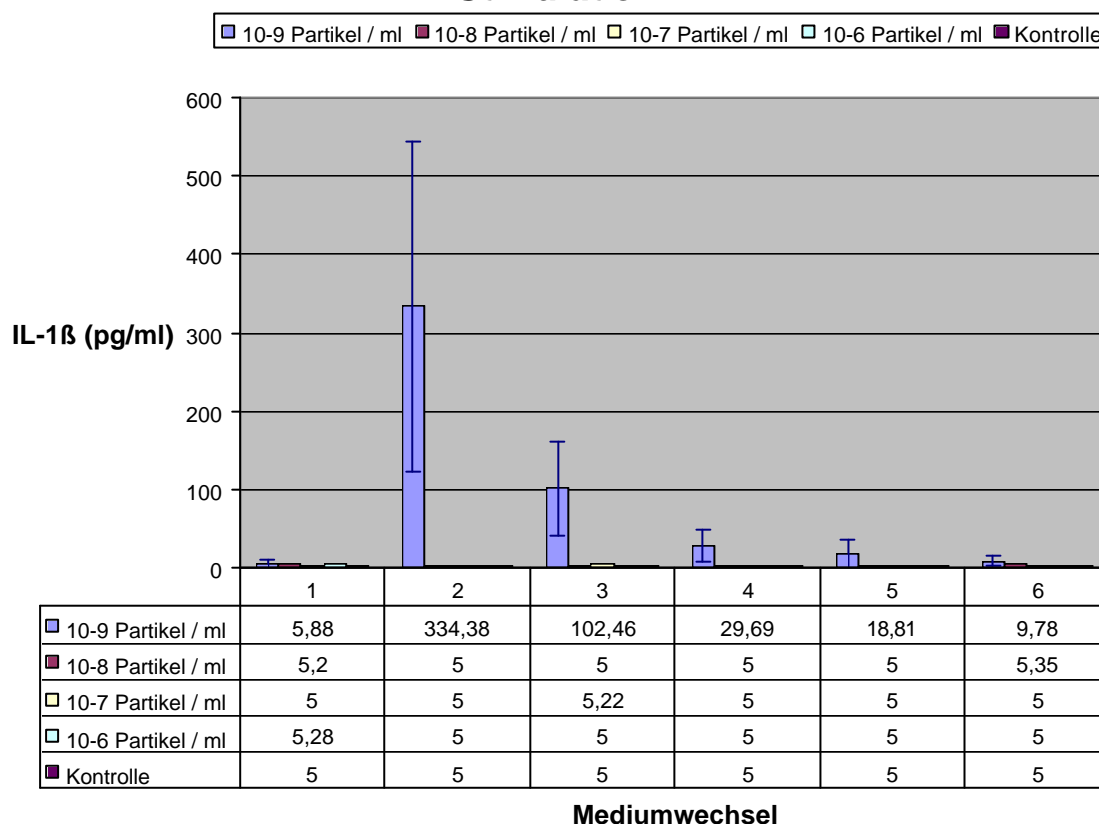
Am 3.Tag der humanen Knochenmarkzellkultur nach Partikelzugabe zeigte sich ein konzentrations-abhängiger IL-6 Anstieg. Für die Partikelkonzentrationen von  $10^9$ ,  $10^8$  und  $10^7$  pro ml Medium ergab sich ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,001$ . Das Maximum der Interleukin-6-Expression ( $\geq 20.000$  pg/ml bei einer mit  $10^9$  Partikel pro ml Medium versetzten Kultur) stieg auf das 20-fache der Kontrollwerte an. Für die Partikelkonzentration von  $10^6$  Partikeln pro ml Medium ergab sich ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,01$ . Diese Resultate müssen unter dem Vorbehalt betrachtet werden, dass bei dem Messverfahren die obere Messgrenze bei 20.000 pg/ml liegt.

Somit wurde beim Erreichen der Obergrenze mit einem Wert von 20.000 pg/ml gerechnet.

(Tabellen siehe Anhang)

- Für IL-1 $\beta$  ergab sich für die jeweiligen Tage der Mediumwechsel das folgende Zytokinmuster:

### ***IL-1 $\beta$ Freisetzung nach Tivaniumpartikel-Stimulation***



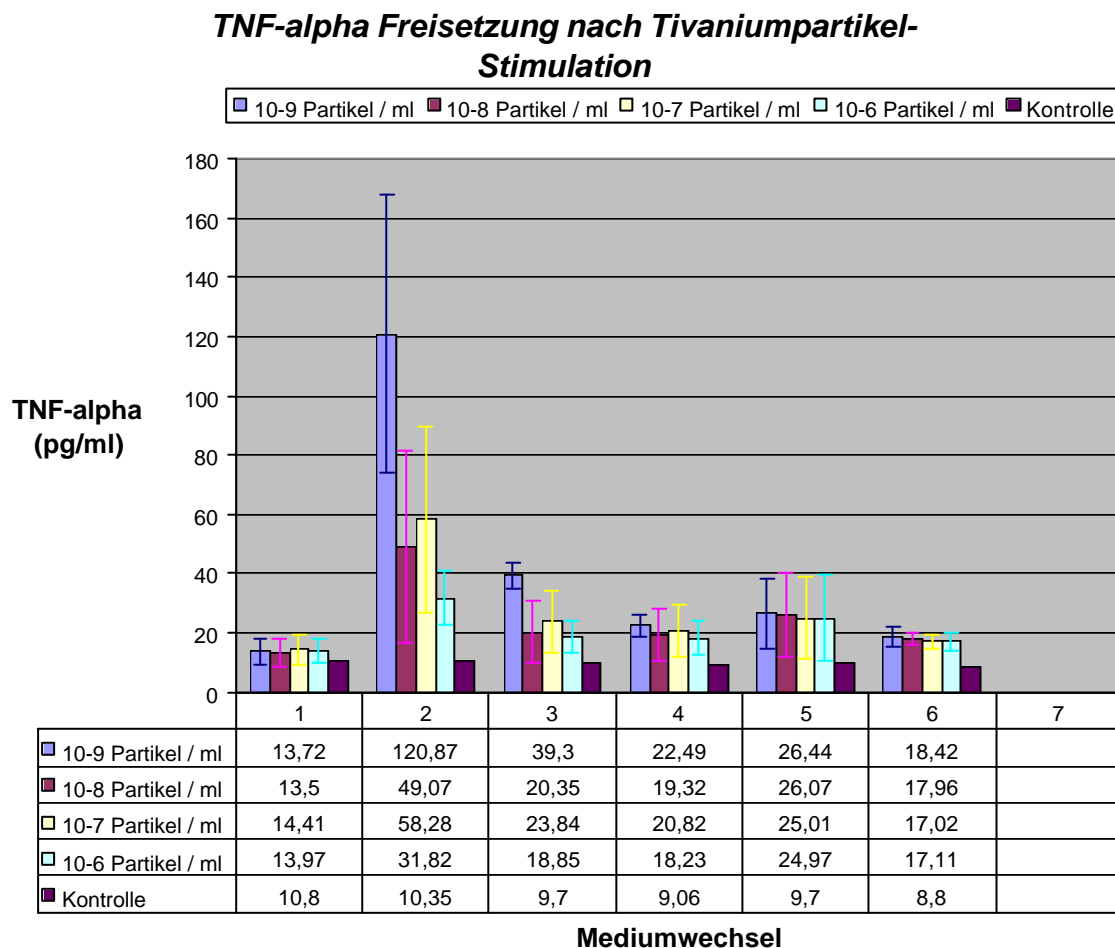
**Abb.29:** Zytokinprofil von Interleukin-1 $\beta$  unter Partikelexposition (Konzentration  $10^9, 10^8, 10^7, 10^6$  Partikel pro ml Medium) und in der Negativkontrolle.

Analog zur IL-6-Expression zeigte sich auch bei der IL-1 $\beta$ -Sekretion am 3.Tag der humanen Knochenmarkzellkultur nach Partikelzugabe ein signifikanter Anstieg. Die IL-1 $\beta$ -Ausschüttung wurde hierbei allerdings nur durch die höchste Konzentration von  $10^9$  Partikeln pro ml Medium stimuliert. Im Vergleich zu den Kontrollkulturen zeigte sich für die höchste Partikelkonzentration ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,01$ . Das Maximum

für IL-1 $\beta$  lag bei 749 pg/ml am 3.Tag der Kultur. Für die Partikelkonzentrationen von  $10^8$ ,  $10^7$  und  $10^6$  ließen sich keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollkultur ermitteln. Hier sollte beim Betrachten der Resultate daran gedacht werden, dass die untere Messgrenze dieses Messverfahrens bei 5 pg/ml liegt. Daher wurde bei den Rechenschritten mit 5 pg/ml gearbeitet.

(Tabellen siehe Anhang)

- Für TNF-a ließen sich an den jeweiligen Tagen des Mediumwechsels die folgenden Werte ermitteln:



**Abb.30:** Zytokinprofil von TNF- $\alpha$  unter Partikelexposition (Konzentration  $10^9, 10^8, 10^7, 10^6$  Partikel pro ml Medium) und in der Negativkontrolle.

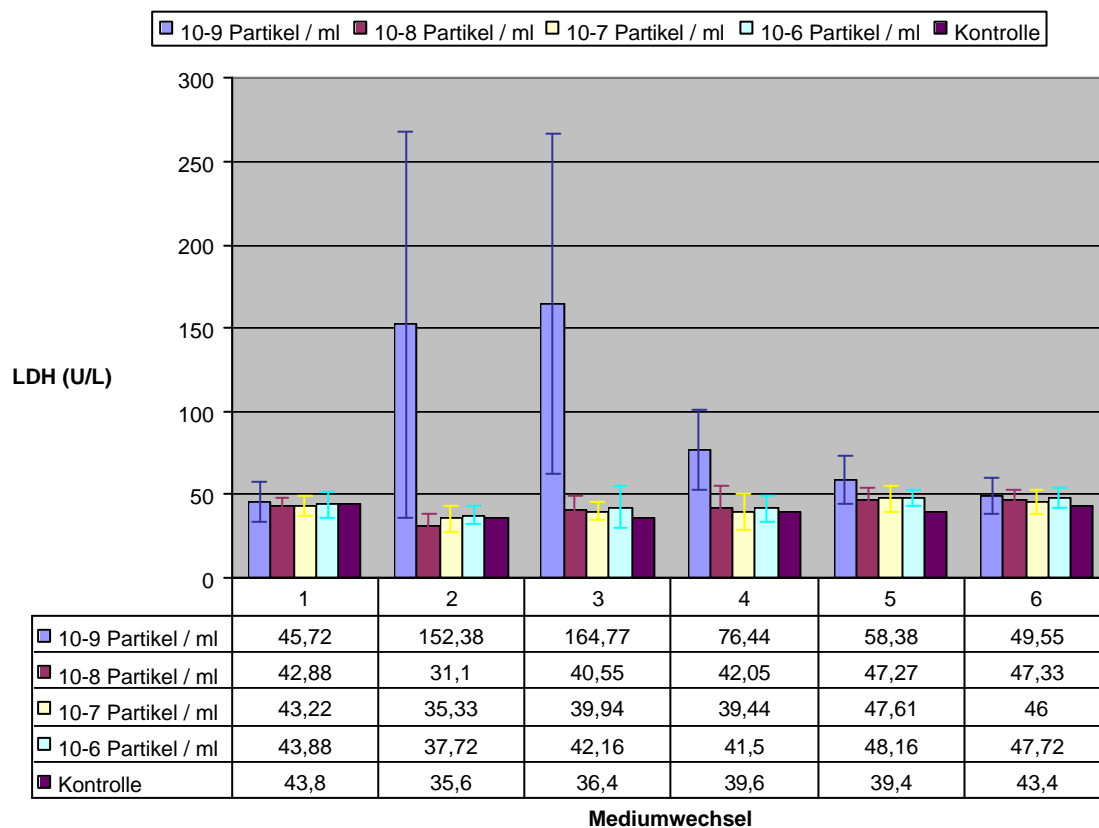
In der humanen Knochenmarkzellkultur zeigte sich auch für die TNF-alpha Expression ein Anstieg am 3.Tag (nach Partikelzugabe) der Kultur. Hier ergab sich ein Anstieg auf das 10-fache der Kontrollwerte für eine Partikelkonzentration von  $10^9$  pro ml Medium und für eine Konzentration von  $10^8$  Partikel pro ml Medium noch eine 5-fache Sekretionssteigerung. Das Signifikanzniveau lag bei  $p \leq 0,001$  für die Partikelkonzentrationen von  $10^9$  und  $10^6$ . Die Konzentrationen von  $10^8$  und  $10^7$  pro ml Medium zeigten noch ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,01$ .

Das Maximum der TNF-alpha Sekretion von 220 pg/ml zeigte die mit  $10^9$  Partikeln pro ml Medium stimulierte Kultur am 3.Tag.

(Tabellen siehe Anhang)

- Die LDH-Messung als Indiz für die Zelltoxizität ergab an den Tagen des Mediumwechsels folgende Ergebnisse:

### ***LDH Aktivität nach Tivaniumpartikel-Stimulation***



**Abb.31:** LDH-Aktivität unter Partikelexposition (Konzentration  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  Partikel pro ml Medium) und in der Negativkontrolle.

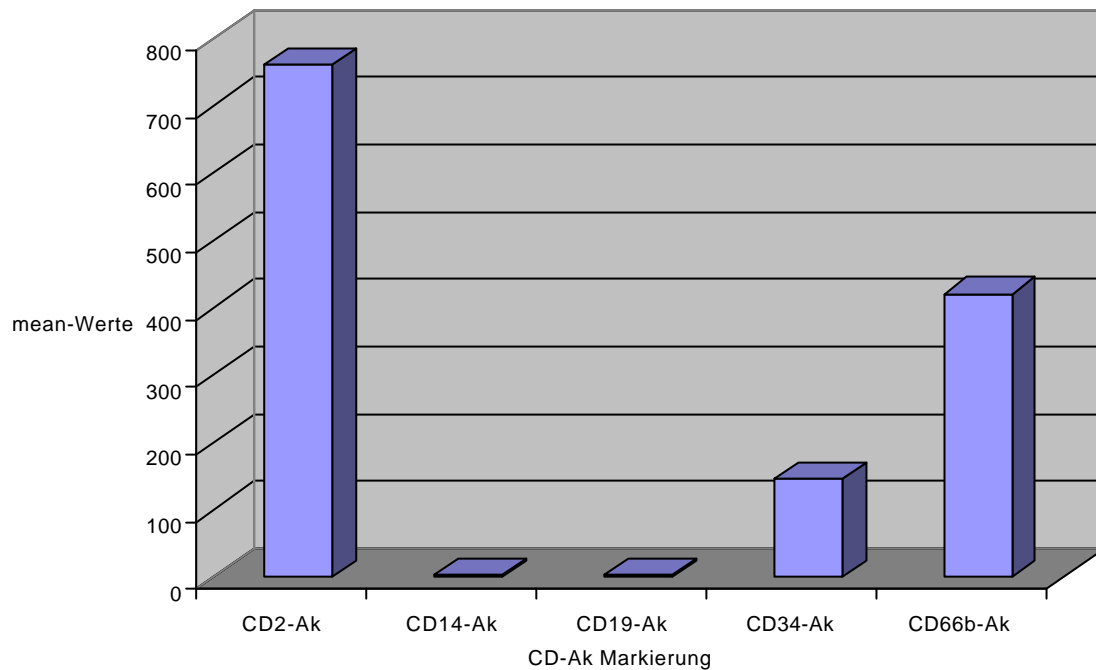
Als Zeichen der Zelltoxizität wurde die LDH-Aktivität gemessen. Hierbei zeigte sich eine signifikant erhöhte Aktivität von LDH beim zweiten und dritten Mediumwechsel nach Partikelzugabe ( $p \leq 0,05$ ) für die maximale Partikelkonzentration von  $10^9$  Partikel pro ml Medium. Bei den anderen Partikelkonzentrationen ließ sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrollkultur ermitteln.

Das Maximum der LDH-Aktivität von 353 Units per Liter zeigte die mit  $10^9$  Partikeln pro ml Medium stimulierte Kultur am Tag des dritten Mediumwechsels.

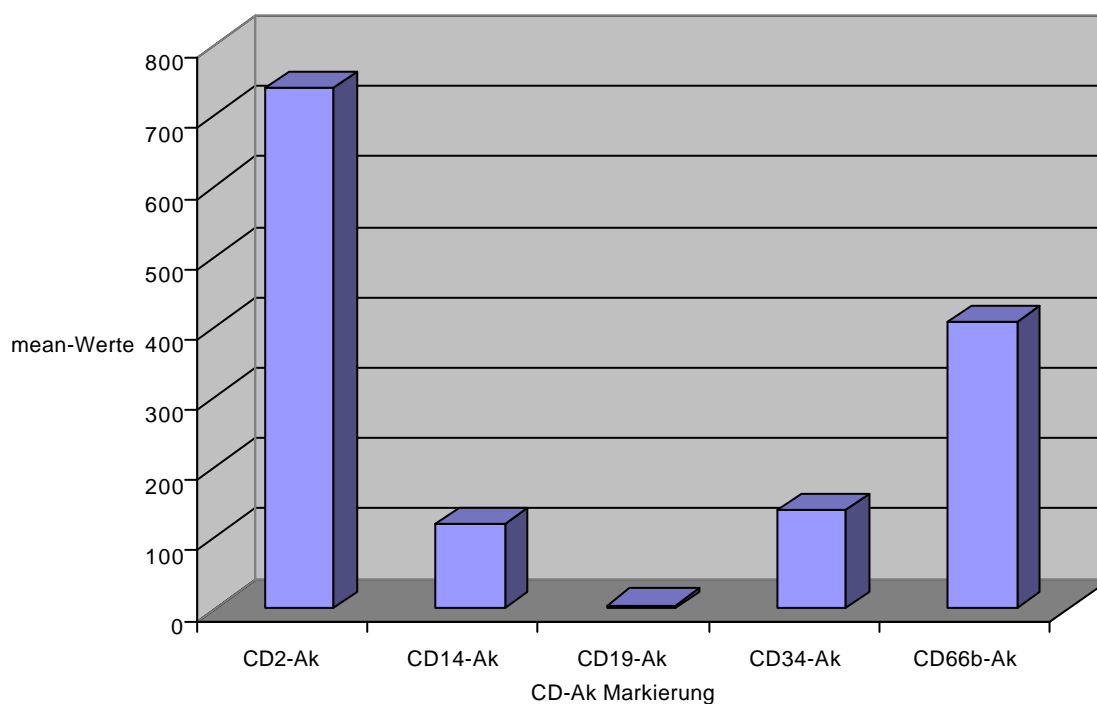
(Tabellen siehe Anhang)



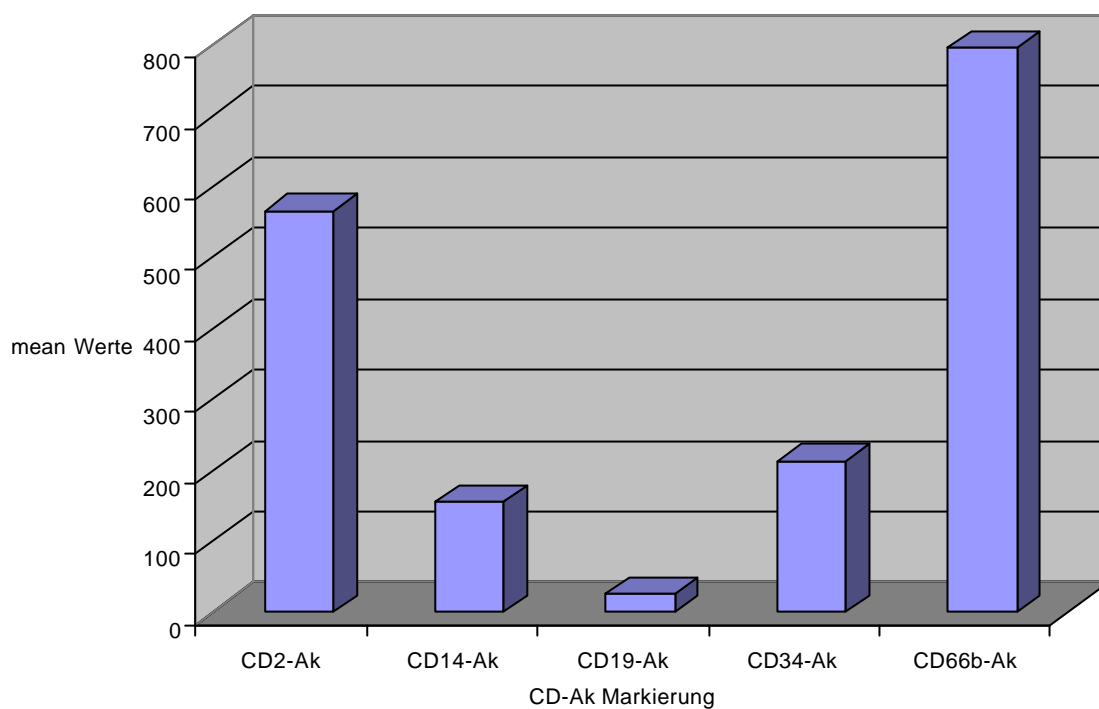
### 5.2.3 Zelldifferenzierung der humanen Knochenmarkzellkultur am Tag der maximalen Zytokinexpression nach Tivaniumpartikelstimulation



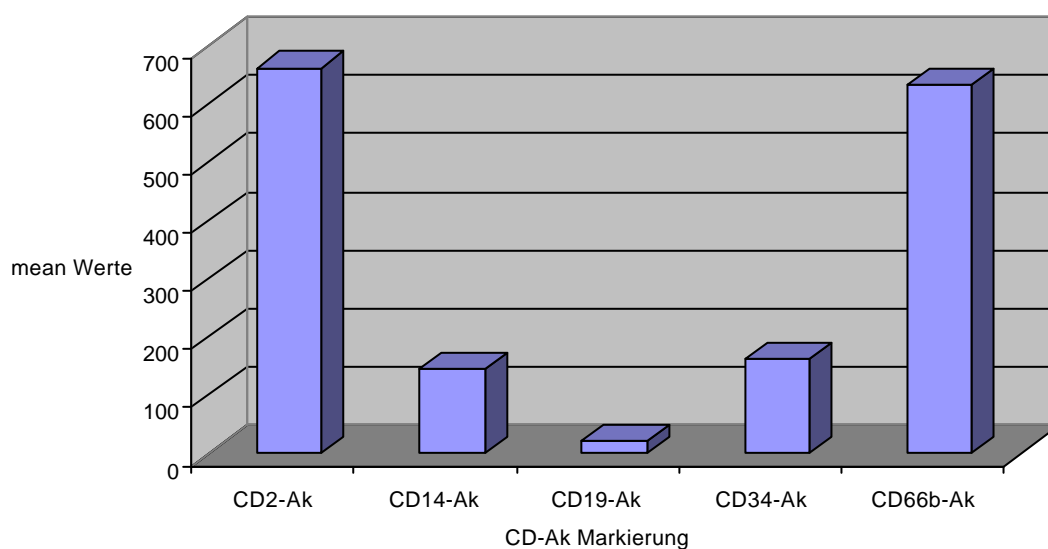
**Abb.32:** Mittelwerte der FACS-Analysen in einer mit  $10^9$  Partikeln pro ml Medium versetzten humanen Knochenmarkzellkultur



**Abb.33:** Mittelwerte der FACS-Analysen in einer mit  $10^8$  Partikeln pro ml Medium versetzten humanen Knochenmarkzellkultur



**Abb.34:** Mittelwerte der FACS-Analysen in einer mit  $10^7$  Partikeln pro ml Medium versetzten humanen Knochenmarkzellkultur



**Abb.35:** Mittelwerte der FACS-Analysen in einer mit  $10^6$  Partikeln pro ml Medium versetzten humanen Knochenmarkzellkultur

Tabellen siehe Anhang!

Zur besseren Interpretation dieser FACS-Ergebnisse wurden diese anhand von verschiedenen Rechenschritten, die im nachfolgenden anhand eines Beispiels erläutert werden, in prozentuale Anteile umgewandelt. Infolge dieser Berechnungen kann man vereinfacht den „mean-Wert“ als Parameter der dominierenden Zellart zum Zeitpunkt der FACS-Analyse heranziehen.

### Beispiel:

Anhand der Ergebnisse der FACS-Analyse einer mit  $10^8$  Partikeln pro ml versetzten Kultur soll das Vorgehen verdeutlicht werden.

#### Mittelwerte der FACS-Analysen

Gate 1 vitale Zelle				Gate 2 Zellreste			
FL-1: grün		FL-2: rot		FL-1: grün		FL-2: rot	
?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean

10 <sup>8</sup> P/ml	Negativkontrolle	All	8,37	3,32	8,37	3,4	78,84	14,58	78,84	17,76
		M1								
	CD14 / CD2	All	13,28	5,08	13,28	637,29	68,53	132,87	68,53	119,47
		M1								
		M2								
		M3								
	CD19 / CD34	All	12,46	5,84	12,46	70,91	70,89	116,3	70,89	86,75
		M1								
	CD66b	All	13,39	10,81	13,39	3,57	72,65	413,37	72,65	43,15
		M1								

*Erläuterungen:*

Total Events = d.h. Gesamtzahl der gezählten Counts

Gate 1 = mit hoher Wahrscheinlichkeit mehr vitale Zellen

Gate 2 = mit hoher Wahrscheinlichkeit mehr Zellreste

Gate 3 = Zelldetritus

% total = Anteil der Events im Gate an den Total Events

mean = Intensität der mit CD-Ak markierten Zellen

All und M1 = markierte Bereiche innerhalb des jeweiligen Gate, keine Bedeutung für die Interpretation.

Unter der Voraussetzung, dass die Intensitätszunahme bei der FACS-Analyse bei allen Antikörpern gleich ist, d.h. unabhängig von der Art des verwendeten Antikörpers erfolgt z.B. bei 1000 gebundenen Antikörpern eine Intensitätszunahme von +200 bei den mean-Werten, können die folgenden Schritte durchgeführt werden.

**Schritt 1:**

% total addieren von Gate 1 und Gate 2 für die jeweiligen CD-Ak.

CD14:  $13,28\% + 68,53\% = 81,81\%$  von 10000 Total Events = 8181 Events

CD19:  $12,46\% + 70,89\% = 83,35\%$  von 10000 Total Events = 8335 Events

CD66b:  $13,39\% + 72,65\% = 86,04\%$  von 10000 Total Events = 8604 Events

CD2:  $13,28\% + 68,53\% = 81,81\%$  von 10000 Total Events = 8181 Events

CD34:  $12,46\% + 70,89\% = 83,35\%$  von 10000 Total Events = 8335 Events

Durchschnittlich wurden 8326,2 Events gewertet.

**Schritt 2:**

Subtraktion der Negativkontroll-Werte zum Ausschluss von Eigenstrahlung der Zellen und anschließende Addition der Mean-Werte in den Gates 1 und 2 für die jeweiligen CD-Ak:

Negativkontrolle (FL-1 grün):  $3,32 + 14,58 = 17,9$

CD14:  $5,08 + 132,87 - 17,9 = 120,05$

CD19:  $5,84 + 16,3 - 17,9 = 4,24$

CD66b:  $10,81 + 413,37 - 17,9 = 406,28$

Negativkontrolle (FL-2 rot)	$3,32 + 14,58 = 17,9$
CD2:	$637,29 + 119,47 - 17,9 = 738,87$
CD34:	$70,91 + 86,75 - 17,9 = 139,7$

### **Schritt 3:**

Die Gesamtintensitätszunahme bei theoretischer gleichzeitiger Verwendung aller getesteter Antikörper ergibt sich durch die Addition der Mean-Werte aller CD-Ak:

$$120,05 + 4,24 + 406,28 + 738,87 + 139,7 = 1409,14$$

### **Schritt 4:**

Durchschnittlich wurden 8326,2 Events in den beiden Gates gewertet (siehe Schritt 1). Division der theoretischen Gesamtintensitätszunahme bei Verwendung aller CD-Ak durch die durchschnittliche Anzahl der Events, liefert eine durchschnittliche Anzahl von Events pro mean-Zunahme:

$$8326,2 \text{ Events} / 1409,14 = 5,9 \text{ Events} / \text{meanzunahme}$$

### **Schritt 5:**

Multiplikation der experimentell ermittelten Mean-Werte der jeweiligen Ak mit der errechneten durchschnittlichen Eventzahl pro mean-Zunahme (Schritt 4) liefert dann den Anteil der entsprechenden CD-positiven Zellen an der Gesamtkultur zum Zeitpunkt der FACS-Analyse (Gesamtzahl der Events: 8113,8).

CD14:	$120,05 * 5,9 = 708,29 \text{ Events}$	$= 8,5 \%$
CD19:	$4,24 * 5,9 = 25,01 \text{ Events}$	$= 0,3 \%$
CD66b:	$406,28 * 5,9 = 2397,05 \text{ Events}$	$= 28,78 \%$
CD2:	$738,87 * 5,9 = 4359,33 \text{ Events}$	$= 52,3 \%$
CD34:	$139,7 * 5,9 = 824,23 \text{ Events}$	$= 9,89 \%$

**Schlussfolgerung:**

Die zum Zeitpunkt der FACS-Analyse dominierenden Zellarten in der mit  $10^8$  Partikeln pro ml Medium versetzten humanen Knochenmarkzellkultur stellen die CD2-positiven Zellen und CD66b-positiven Zellen dar.

**Fazit:**

Bei jeder humanen Knochenmarkzellkultur, welche mit Abriebpartikeln versetzt wurde ließ sich am Tag der maximalen Zytokinexpression anhand der FACS-Analyse als dominierende Zellarten die CD2-positiven und die CD66b-positiven Zellen identifizieren.

Mit Reduktion der Partikelkonzentration kam es allerdings zu einer leichten Abnahme des Anteils an CD2-positiven Zellen und zu einer geringen Zunahme an CD66b-positiven Zellen.

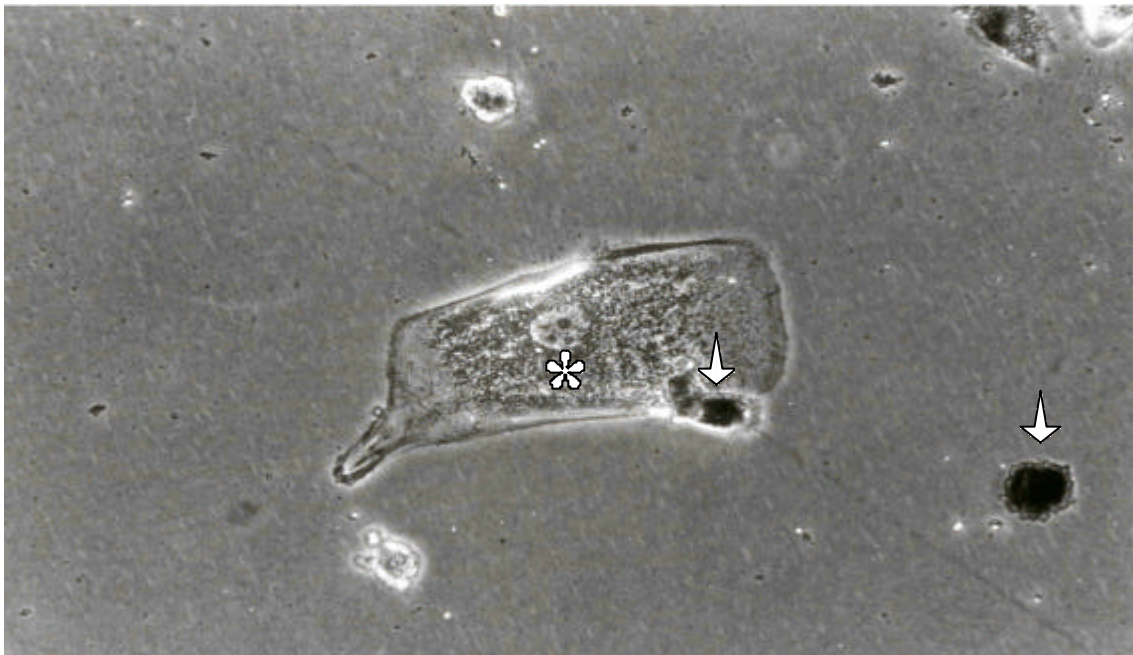
Die CD14-positiven Zellen waren bei den mit  $10^9$  Partikeln pro ml Medium versetzten Kulturen nur in kleinen Mengen vorhanden. Allerdings kam es zu einer Zunahme ihres Anteils bei den mit  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  Partikel pro ml Medium versetzten Kulturen.

Der Anteil an CD-34-positiven und CD-19-positiven Zellen war bei allen Partikelkonzentrationen gleich geblieben.

## *VI. Diskussion*

### *6.1 Allgemeine Betrachtung*

Die in dieser Studie verwendeten Tivanium-Partikel sind mit einer Größe = 1µm hinreichend klein, um biologische Effekte erzielen zu können.[Schmalzried T et al 1997, Haynes DR et al 1993]



**Abb.36:** Phagozytose von Tivaniumabriebpartikeln (Durchlichtmikroskopie, Vergrößerung 20x);

\* ≙ Zelle, → ≙ Partikel

Der Hauptaussagepunkt dieser Studie ist der Nachweis, dass die zugesetzten Abriebpartikel innerhalb der humanen Knochenmarkzellkultur zu einer signifikanten Erhöhung der Freisetzung proinflammatorischer und osteolytisch wirkender Mediatoren führen. Auf diesem Wege sind sie in der Lage, eine Situation zu erschaffen und zu unterhalten, die zu einer Lockerung von Endoprothesen führen kann. Zusätzlich fand man durch die Kombination der Ergebnisse von Zytokinprofil und Zelldifferenzierung einen Hinweis, wieso es zu einer solchen exzessiven Zytokinproduktion kommen kann bzw. welche Zellen anscheinend dafür verantwortlich sind. Von allen in dieser Studie untersuchten Zytokinen (Interleukin-6, Interleukin-1β und TNF-α) ist der Einfluss auf die Regulation des Knochenstoffwechsels mit dem Resultat der Osteolyse bekannt.



Betrachtet man die Ergebnisse, lässt sich eine Korrelation zwischen Zelltod und maximaler Zytokinfreisetzung bei der höchsten Partikelkonzentration von  $10^9$  Partikel pro ml Medium vermuten.

Obwohl es möglich sein kann, dass diese Zytokine erst beim Zelltod freigesetzt werden ist es wahrscheinlicher, dass die Zytokinexpression durch Partikel vor dem Zelltod stimuliert wird. Frühere Studien zeigten bereits, dass ein partikelinduzierter Zelltod frühestens nach 8 h oder später nach Partikelkontakt erfolgt. Demgegenüber erfolgt aber eine Partikel-induzierte Zytokinfreisetzung bereits 4 h nach Partikel-Phagozytose. [Howie DM 1996] Diesen Effekt nachzuweisen war nicht Ziel dieser Studie. Allerdings werden in nächster Zukunft auch zu diesem Thema Experimente durchgeführt werden.

Daneben wurde gezeigt, dass Partikel, die schließlich zum Zelltod führen, im Vergleich zu nichttoxischen Partikeln wesentlich weniger Zytokine produzieren. [Haynes DR et al 1993]

Das Zusammenspiel beider Effekte (Zelltod und Partikelstimulation) führt schließlich zur Kumulation an Zytokinen und damit zur immer weiter fortschreitenden Entzündungsreaktion mit konsekutivem Knochensubstanzverlust bzw. Lockerung der Prothese.

Die in dieser Studie gefundenen Resultate zeigen, dass die biologischen Reaktionen bei Tivaniumexposition von der Partikelkonzentration abhängig sind. Die in Revisionsgeweben von Patienten mit einer aseptischen Lockerung einer Endoprothese gefundene Menge an Tivanium entspricht etwa  $818 \mu\text{g} / \text{ml}$ . Nimmt man eine Partikelgröße von  $1 \mu\text{m}$  im Durchmesser an, entspräche das ungefähr einer Konzentration von  $4 \times 10^8$  Partikel pro ml. [Agins HJ et al 1988] Diese Konzentrationen entstehen im Laufe der Zeit, wobei die Einflüsse auf die Knochenstoffwechselregulation schon bei geringeren Konzentrationen beginnen.

In unserer Studie zeigten sich die ersten signifikanten Veränderungen bereits bei einer Partikelkonzentration von  $10^6$  pro ml Medium, die dann mit zunehmender Partikelkonzentration immer stärker wurden. In diesem Zusammenhang muss man sich ebenfalls die Frage stellen, ob die signifikant erhöhte Freisetzung proinflammatorischer und osteolytisch wirkender Mediatoren ein Effekt ist, der auch ohne den Zusatz von Wachstumsfaktoren eintritt oder aber lediglich eine Folge des Zellprimings ist. Die zu diesem Thema durchgeführten Experimente zeigten, dass es im Vergleich beider

Zellkulturen (mit Zusatz im Vergleich zu ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren) zu keinerlei signifikanten Veränderungen der Zytokinfreisetzung bzw. LDH-Aktivität kam. Die in dieser Studie verwendete humane Knochenmarkzellkultur zeichnet sich in ihrer Position als Effektorgewebe der Endoprothesen aus, da der Prothesensitz „in situ“ im Knochenmark zu finden ist.

Im experimentellen Untersuchungszeitraum einer humanen Knochenmarkzellkultur-Kontrolle ohne Zusatz von Partikel zeigte sich im Hinblick auf dessen Zelldifferenzierungsverhalten keinerlei Störung. Die Kulturen wiesen über einen Zeitraum von zwei Wochen konstante Zellpopulationen bezüglich der B-, T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Stammzellen auf.

Dies ist den letzten Jahren mehrfach gezeigt worden. [Wilke et al 1991 a,b, 1992, 1993, 1995, 1998, 1999, 2000]

Um das System der aseptischen Lockerung verstehen zu können, wurde am Tag der maximalen Zytokinfreisetzung zur Identifizierung der zu diesem Zeitpunkt dominierenden Zellarten eine FACS-Analyse durchgeführt.

Durch die gemeinsame Betrachtung von Zytokinprofil, Zellzahlentwicklung sowie FACS-Analyse lässt sich eine Hypothese zur Klärung der aseptischen Lockerung von Prothesen aufstellen.

Am Tag dieser maximalen Zytokinfreisetzung (3. Tag nach Partikelexposition) konnte man bei allen Partikelkonzentrationen als dominierende Zellarten die CD-2 positiven Zellen (T-Zelle / natürliche Killerzelle) und die CD-66b-positiven Zellen (Granulozyten/Makrophagen) nachweisen. Auffällig war zudem, dass mit Reduktion der Partikelkonzentration ein Anstieg des Anteils an CD-66b-positiven Zellen nachgewiesen werden konnte. In der mit der maximalen Partikelkonzentration versetzten humanen Knochenmarkzellkultur bestand noch ein Verhältnis von 2:1 zugunsten der CD-2-positiven Zellen (NKZ / T-Zelle), während es bei der niedrigsten Konzentration zum Ausgleich dieses Verhältnisses kam. Der Anteil an CD-34-positiven (hämatopoetische Vorläuferzelle) und CD-19-positiven Zellen (= B-Zelle) war bei allen Partikelkonzentrationen gleich geblieben.

Für die CD-14-positiven Zellen (= Monozyten) konnte eine Zunahme des Anteils in den Konzentrationen von  $10^8$  –  $10^6$  Partikeln pro ml Medium im Vergleich zur maximalen Partikelkonzentration von  $10^9$  pro ml Medium gesehen werden.

Im Rahmen der Zytokinfreisetzung konnte man eine exzessive Produktion von IL-6 und TNF- $\alpha$  bei allen Partikelkonzentrationen beobachten. Da IL-6 von allen in der humanen Knochenmarkzellkultur vorherrschenden Zellarten produziert und sezerniert wird ist es verständlich, dass es daher auch am stärksten freigesetzt wird und sein Maximum nach maximaler Stimulation durch Partikel erfährt. TNF- $\alpha$  dagegen wird lediglich von NKZ und Makrophagen sezerniert und zeigt daher eine im Vergleich zur IL-6 Freisetzung geringere Konzentration.

Für IL-1 $\beta$  war eine vermehrte Zytokinfreisetzung nur bei der maximalen Konzentration von  $10^9$  Partikeln pro ml zu finden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass IL-1 $\beta$  vorwiegend durch Makrophagen und tote Zellen freigesetzt wird. Dass es lediglich im Rahmen der maximalen Partikelstimulation mit  $10^9$  pro ml Medium zum Zelluntergang kam, ließ sich durch die LDH-Bestimmung nachweisen.

Produktion von	Zytokin	Funktion
T-Zelle /NKZ/ Makrophage	IL-6	Wachstum und Differenzierung von T- und B-Zellen; Immunantwort der akuten Phase
T-Zelle/ NKZ / Makrophage	GM-CSF	Stimuliert Wachstum und Differenzierung der myelomonozytischen Linie
NKZ	Interferon-gamma	Aktivierung der Makrophagen; erhöhte MHC-Expression
NKZ / Makrophage	TNF-alpha	lokale Entzündung; Endothelaktivierung
Makrophagen / tote Zellen?	IL-1beta	T-Zell-Aktivierung; Makrophagenaktivierung

NKZ = Natürliche Killerzelle

**Tab.7:** Zytokine, deren Funktion und Hauptproduktionsort

[Kayser FH et al 1998]

***Hypothese zum Ablauf der aseptischen Lockerung:***

Durch die Produktion von Abriebpartikeln, welche sich im periprothetischen Gewebe ablagern, dort als Antigene erkannt und phagozytiert werden, wird eine unspezifische Immunantwort ausgelöst. Infolgedessen kommt es vorrangig zu einer Vermehrung der natürlichen Killerzellen, die wiederum durch Mediatoren zu einer Aktivierung weiterer Entzündungszellen führen. Vermutlich kommt es durch die Produktion von Interferon- $\gamma$  zur Aktivierung von Makrophagen. Aktivierte Makrophagen führen ihrerseits wiederum zur Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  sowie GM-CSF. TNF- $\alpha$  löst eine lokale Entzündungsreaktion aus, während IL-1 $\beta$  zu einer Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen führt.

Durch diese Mechanismen lässt sich der exzessive Anstieg der Zytokine hinreichend erklären. IL-6 wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und T-Zellen produziert. IL-1 $\beta$  wird von Makrophagen und toten Zellen freigesetzt und TNF- $\alpha$  vornehmlich durch Makrophagen und natürlichen Killerzellen sezerniert.

Trindade et al konnten in einer Studie aus dem Jahre 1999 zeigen, dass Interferon- $\gamma$  zu einer vermehrten Freisetzung von IL-6 und TNF- $\alpha$  in einer partikel-versetzten Monozyten- / Makrophagen-Kultur führt. Zusätzlich konnten sie nachweisen, dass durch eine Blockade von Interferon- $\gamma$  mit Antikörpern die partikel-induzierte Zytokinfreisetzung ausbleibt. [Trindade et al 1999]

Damit ließe sich unter Berücksichtigung aller Untersuchungsergebnisse die folgende Schlussfolgerung ziehen:

1. Die natürliche Killerzelle bzw. T-Zelle stellt mit großer Wahrscheinlichkeit die entscheidende Zelle im System der partikel-induzierten Immunantwort dar, da von ihr die Entzündungsreaktion ausgeht und unterhalten werden kann.

Zur Sicherung dieser Hypothese fehlt allerdings die Bestimmung von Interferon- $\gamma$ . Somit kann zu diesem Zeitpunkt keine definitive Aussage getroffen werden, ob es tatsächlich durch die natürliche Killerzelle, infolge der Interferon- $\gamma$ -Produktion, zum Anstoß und Unterhalt der Entzündungsreaktion kommt. Die Untersuchung von

Interferon- $\gamma$  und ein Nachweis über die verstärkte Aktivität von bestimmten Zellen (NKZ; T- und B-Lymphozyten; Makrophagen) in der partikelversetzten humanen Knochenmarkzellkultur werden in nächster Zukunft durchgeführt werden.

## 6.2 Zellkulturergebnisse im Vergleich

Ergebnisse von Haynes und Mitarbeitern und Rogers und Mitarbeitern konnten in unserem Zellkulturmodell nicht komplett bestätigt werden. [Rogers SD et al 1997, Haynes DR et al 1997, 1998]

Haynes und Mitarbeiter [Haynes DR et al 1998] inkubierten über einen Zeitraum von 48 h humane, mononukleäre Phagozyten mit Tivanium-Partikeln in zwei unterschiedlichen Konzentrationen, um dann die Zytokinlevel zu bestimmen. Zu Kulturbeginn wurden  $4 \times 10^6$  Zellen pro „well“ ausgesät. Bei einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Partikel / ml Medium zeigte sich lediglich ein gering signifikanter Anstieg der Zytokine Interleukin- $1\beta$ , Interleukin-6 und TNF- $\alpha$ . Tivanium-Partikel in einer Konzentration von  $4 \times 10^7$  Partikel / ml Medium erhöhten die Freisetzung aller Zytokine ungefähr um das fünffache. Für Interleukin-6 lagen die Werte bei 3917 pg / ml, für Interleukin- $1\beta$  bei 154 pg / ml und für TNF- $\alpha$  bei 1010 pg / ml (jeweils im Durchschnitt). Die Ergebnisse der Kontrollkulturen demonstrierten hier Werte für Interleukin- $1\beta$  von 21 pg / ml, für Interleukin-6 713 pg / ml und für TNF- $\alpha$  199 pg / ml (jeweils im Durchschnitt). [Haynes DR et al 1998]

Bei vergleichbarer Zell- und Partikelzahl haben wir dagegen in unserem Zellkulturmodell keinen Anstieg der Interleukin- $1\beta$ -Freisetzung nachweisen können. Für TNF- $\alpha$  ließ sich zwar ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Freisetzung nachweisen, jedoch war dieser in unserer Studie um den Faktor 10 deutlich weniger ausgeprägt. Die Interleukin-6-Freisetzung demonstrierte vergleichbare Ergebnisse. Insgesamt gesehen zeigten sich, im Vergleich zu unserer Studie, differente Werte in den Kontrollkulturen.

In einer weiteren Studie von Haynes aus dem Jahre 1997 [Haynes DR et al 1997] wurde die durch Partikel induzierte Zytokinfreisetzung anhand einer humanen Monozyten-Kultur untersucht. Zu Kulturbeginn wurden  $4 \times 10^6$  Zellen pro „well“ ausgesät. In dieser Studie wurde der Zeitraum von 48 h Kulturdauer beibehalten, um anschließend die Zytokinlevel zu bestimmen. Haynes und Mitarbeiter verwendeten unterschiedliche Konzentrationen für Tivanium:  $6,25 \times 10^5$  Partikel / ml Medium,  $2,5 \times 10^6$  Partikel pro ml Medium,  $1 \times 10^7$  Partikel / ml Medium und  $4 \times 10^7$  Partikel / ml Medium. Die mit

Tivanium versetzte Kultur zeigte hier lediglich signifikante Unterschiede in einer Konzentration von  $4 \times 10^7$  Partikel / ml Medium. Für Interleukin-6 zeigten sich hier durchschnittliche Maximalwerte von etwa 350 pg / ml. Bei der Interleukin-1 $\beta$  Expression fanden sich durchschnittliche Maximalwerte von etwa 100 pg / ml. Für TNF-alpha lagen die durchschnittlichen Maximalwerte bei 80 pg / ml.

Bei vergleichbarer Zell- und Partikelzahl fanden wir in unserem Zellkulturmodell keinen Anstieg der Interleukin-1 $\beta$ -Freisetzung bei einer Partikelkonzentration von  $10^7$  pro ml Medium. Die TNF- $\alpha$ -Freisetzung zeigte einen vergleichbaren Anstieg, der jedoch in unserer Studie um den Faktor 2 weniger ausgeprägt war. Interleukin-6 demonstrierte dagegen etwa 10-fach höhere Werte.

Rogers und Mitarbeiter [Rogers SD et al 1997] verwendeten eine Zellkultur aus humanen peripheren Blutmonozyten, die mit  $4 \times 10^6$  Zellen pro well ausgesät wurden. Diese Kulturen wurden mit zwei unterschiedliche Konzentrationen für Tivanium,  $1 \times 10^7$  Partikel / ml Medium und  $4 \times 10^7$  Partikel / ml Medium versetzt. Der Kulturzeitraum betrug wie bei den anderen beiden Studien 48 h. Bei der Interleukin-6 Expression ließ sich lediglich ein signifikanter Anstieg bei der höchsten Partikelkonzentration von  $4 \times 10^7$  Partikel / ml Medium feststellen. Das Maximum lag hier bei etwa 9000 pg / ml.

Für Interleukin-1 $\beta$  zeigte sich ebenfalls nur ein signifikanter Anstieg bei der maximalen Partikelkonzentration von  $4 \times 10^7$  Partikel / ml Medium. Das Maximum lag für IL-1 $\beta$  bei etwa 450 pg / ml. TNF-alpha dagegen demonstrierte signifikante Unterschiede in den Partikelkonzentrationen von  $1 \times 10^7$  Partikel / ml Medium und  $4 \times 10^7$  Partikel / ml Medium mit einem Maximum von etwa 1200 pg / ml.

In unserem Zellkulturmodell zeigten sich bei vergleichbarer Zell- und Partikelzahl für Interleukin-6 in allen Konzentrationen signifikant erhöhte Werte. Im Durchschnitt lagen sie allerdings nur bei 4105,13 pg/ml. Bei der Interleukin-1 $\beta$ -Freisetzung konnten wir keinen Unterschied im Vergleich zu den Kontrollkulturen (< 5 pg/ml) nachweisen. Sie blieben jeweils unterhalb der Nachweisgrenze. Die TNF-apha Werte waren verglichen mit unseren Ergebnissen 30-fach höher.

Die entscheidenden Unterschiede zu den anderen Studien waren:

1. Verwendung eines humanen Knochenmarkzellkulturmodells mit
2. Partikelkonzentrationen von  $10^6$  –  $10^9$  Tivanium-Partikel pro ml Medium und
3. ein Kulturzeitraum von 14 Tagen nach Partikelexposition.

Beim dritten Mediumwechsel (entspricht ca. 72 h nach Kulturbeginn) zeigten sich im Vergleich zu den anderen Studien von Haynes und Rogers (gleiche Zell- und Partikelzahl) bei unseren Kontrollkulturen differente Ausgangswerte. Die Werte für Interleukin-1 $\beta$  blieben unterhalb des Messbereiches von 5 pg / ml, während sie für Interleukin-6 und TNF- $\alpha$  im Mittelwert 1454 pg / ml bzw. 10,35 pg / ml betrugen. Daneben wurden Partikelkonzentrationen verwendet, die von  $10^6$  –  $10^9$  Tivanium-Partikel pro ml Medium reichten. Der Kulturzeitraum betrug 21 Tage.

Zusammenfassend konnten wir dabei die konzentrationsabhängige Zytokinfreisetzung für Interleukin-6 und TNF- $\alpha$  allerdings in etwas anderen Dimensionen bestätigen. Für Interleukin-1 $\beta$  ließ sich nur ein signifikanter Anstieg bei einer Partikelkonzentration von  $10^9$  pro ml nachweisen.

Eine signifikant erhöhte Zelltoxizität ließ sich dagegen lediglich bei einer Partikelkonzentration von  $10^9$  pro ml Medium mittels der LDH-Bestimmung in Verbindung mit der Zellzahlermittlung nachweisen.

Für das von uns gewählte, humane Knochenmarkzellkulturmodell scheinen Interleukin-6 mit einem Anstieg auf das 10-fache, TNF-alpha mit einem Anstieg auf das 20-fache und Interleukin-1 $\beta$  mit einem Anstieg auf das 100-fache der Ausgangswerte nach Partikelexposition (Maximum: = 20000 pg/ml für IL-6 bzw. 220 pg / ml für TNF $\alpha$  und 552 pg / ml für IL-1 $\beta$ ) die entscheidenden Zytokine zu sein.



Der Unterschied der Zytokinprofile in den Studien von Haynes und Rogers [Rogers SD et al 1997, Haynes DR et al 1997, 1998] lässt sich allem Anschein nach durch die FACS-Analyse der humanen Knochenmarkzellkultur unter Partikelexposition zum Zeitpunkt der maximalen Zytokinfreisetzung erklären.

Die entscheidenden Unterschiede im Zytokinprofil der anderen Studien zu unserem Zytokinprofil der humanen Knochenmarkzellkultur lagen vor allem in der vermehrten Produktion von TNF-alpha sowie einer stark erhöhten IL-1 $\beta$ -Freisetzung, bei vergleichbaren Interleukin-6 Werten. In diesen Studien wurde lediglich mit reinen „Monozellkulturen“ gearbeitet, die entweder aus Monozyten oder Makrophagen zusammengesetzt waren. Unsere Zellkultur verwendete dagegen eine physiologische Mischkultur aus humanem Knochenmark.

Im Vergleich der „Monozellkulturen“ zu Mischkulturen, muss man bedenken, dass in den Monozellkulturen die absolute Zellzahl dieser Zelllinie deutlich höher ist als im Vergleich zur absoluten Zellzahl in der Mischkultur.

Da IL-1 $\beta$  hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen freigesetzt wird, ist es nicht verwunderlich, dass es bei vergleichbarer Versuchsanordnung aufgrund der absoluten Zellzahl eher zu einer erhöhten Freisetzung dieses Zytokins in der reinen Makrophagen/Monozyten-Kultur kommt als in einer Mischkultur. Gleiches gilt ebenfalls für TNF-alpha, welches zum größten Teil von Monozyten/Makrophagen und natürlichen Killerzellen produziert wird. Da TNF-alpha von diesen zwei Zellpopulationen produziert wird ist der Unterschied zur Freisetzung in der Mischkultur nicht so stark ausgeprägt wie bei IL-1 $\beta$ .

Im Rahmen der Interleukin-6-Freisetzung zeigten sich vergleichbare Werte, was durch den Produktionsort begründet werden kann. IL-6 wird vornehmlich in Makrophagen/Monozyten, NKZ und T-Zellen gebildet und freigesetzt. Somit hebt sich der Unterschied zwischen den Monozellkulturen und den Mischkulturen wieder auf.

Weitere Unterschiede fanden sich in den jeweils verwendeten Versuchsanordnungen. Zum einen gab es nur eine kurze Inkubationszeit (48 h  $\leftrightarrow$  14 Tage nach Partikelzugabe), zum anderen wurden Zellen verwendet, die nicht der Situation „in situ“ entsprechen.

Es ist schwierig die oben genannten Monozellkulturen mit einer in dieser Studie verwendeten Mischkultur zu vergleichen. Man sollte allerdings in Frage stellen, ob es

überhaupt sinnvoll ist, Monozellkulturen in der Erforschung der „particle disease“ einzusetzen. Immerhin treten „in situ“ die Endoprothesen mit dem Knochenmark in Kontakt und dies ist bewiesenermaßen keine „Monozellkultur“, sondern vielmehr eine „Mischkultur von humanen Knochenmarkzellen“.

Zusätzlich konnte in dieser Studie durch die Zelldifferenzierung gezeigt werden, dass es möglicherweise durch das Zusammenspiel verschiedener Zellarten, im Mittelpunkt die natürliche Killerzelle, zur aseptischen Lockerung kommen kann. Somit ist es nicht sinnvoll Monozellkulturen zur Erforschung der aseptischen Lockerung zu verwenden, sondern vielmehr Mischkulturen (humane Knochenmarkzellkultur) einzusetzen.

## ***6.3 Vorteile der humanen Knochenmark-Zellkultur***

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten deutlich die Vorteile einer humanen Knochenmarkzellkultur. Die Sensitivität der humanen Knochenmarkzellkultur wurde bewiesen, da sich die Ergebnisse im Vergleich zwischen den Kontrollen und den Tivanium-Kulturen eindeutig hinsichtlich ihres Zytokinprofils und der Zelldifferenzierung unterschieden. Für die Kontroll-Kulturen zeigte sich im dreiwöchigen Kulturverlauf kein wesentlicher Unterschied in Bezug auf Zellzahl, Zytokinprofil und Zelldifferenzierung. Dagegen demonstrierten die Tivanium-Kulturen deutliche Veränderungen im Bereich dieser Kriterien. Die Sensitivität unseres humanen Knochenmarkzellkultur-Modells wurde auch bei der Untersuchung des Zytokinprofils einer mit Chrom-Kobalt-Partikeln versetzten humanen Knochenmarkzellkultur (gleiche Versuchsanordnung) bestätigt. [Wilke et al 2000]

Bei der mit Tivaniumpartikeln versetzten humanen Knochenmarkzellkultur wurde für Interleukin-6 eine konzentrationsabhängige, signifikant erhöhte Freisetzung mit einem Maximum von 20.000 pg/ml ( $\cong$  obere Messgrenze) beobachtet (bei einer Konzentration von  $10^9$  Partikel pro ml Medium). Bei der Interleukin-1 $\beta$ -Freisetzung ließ sich lediglich bei der höchsten Partikelkonzentration ( $10^9$  pro ml Medium) ein signifikanter Anstieg nachweisen. TNF- $\alpha$  demonstrierte analog zur IL-6-Freisetzung ebenfalls eine konzentrations-abhängige, signifikant erhöhte Freisetzung bei allen Partikelkonzentrationen. Das Maximum der Zytokinfreisetzung lag hierbei am 3.Tag der Kultur nach Partikelzugabe.

In der Chrom-Cobalt-Studie, d.h. CrCoMb Partikel wurden einer humanen Knochenmarkszellkultur zugesetzt, zeigte sich eine zum Teil genau entgegengesetzte Zytokinexpression gegenüber der Tivanium-Studie; vor allem im Hinblick auf die Interleukin-6-Freisetzung zeigte sich eine der Konzentration umgekehrt proportionale Zytokinfreisetzung, wobei das Maximum bei einer Konzentration von  $10^5$  Partikel pro ml Medium zu finden war. Für Interleukin-1 $\beta$  zeigte sich in dieser mit Chrom-Cobalt-Partikeln versetzten Zellkultur bei einer Partikelkonzentration von  $10^7$  und  $10^8$  pro ml Medium ein signifikanter Anstieg am dritten Tag der Kultur nach Partikelzugabe.

TNF- $\alpha$  zeigte eine signifikant vermehrte Expression bei allen Konzentrationen ( $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  Partikel pro ml Medium). Das Maximum der Zytokinfreisetzung fand sich hier am 6. Tag der Kultur nach Partikelzugabe. [Wilke et al 2000]

Die Sensitivität dieses Modells wird insofern bekräftigt, da es infolge unterschiedlicher Stimuli (Titaniumpartikel vs. CrCoMb-Partikel) in der humanen Knochenmark-Zellkultur zu einer entsprechend dem vorangegangenen Stimulus charakteristischen Reaktion kommt.

Warum es bei der Chrom-Cobalt-Studie im Vergleich zur Titanium-Studie zu einem unterschiedlichen Zytokinprofil kommt, kann abschließend noch nicht genau geklärt werden. In dieser Studie lässt sich die Zytokinfreisetzung nach Titanium-Abriebpartikelstimulation durch die Zelldifferenzierung hinreichend erklären. Bekannt ist, dass Chrom-Kobalt andere biologische (toxische) und materialtechnische Eigenschaften aufweist als Titanium. [Süry 1975, Park 1994, Haynes et al 1998] Dies könnte ein Grund für das differente Zytokinprofil darstellen. Auf der anderen Seite stehen die Ergebnisse der Zelldifferenzierung noch aus, die vermutlich infolge der unterschiedlichen Zelldifferenzierung im Vergleich zu dieser Studie eine hinreichende Erklärung bieten werden.

Ein weiterer großer Vorteil dieses Modells ist, dass Tierversuche zur Biokompatibilitätsprüfung von Materialien (Partikeln) auf ein Minimum reduziert werden können. Eine präklinische Biokompatibilitätsprüfung kann somit ohne großen Aufwand erfolgen, da das humane Knochenmark quasi als Nebenprodukt bei Hüftgelenkendoprothesen-Operationen anfällt. Daneben bietet es den Vorteil, dass die verwendeten Zellen auch „in situ“ in unmittelbaren Kontakt mit dem jeweils verwendeten Biomaterial stehen. Im Vergleich mit anderen Studien, die zum Teil Zellen tierischen Ursprungs verwendeten, zeigt sich eine hohe Korrelation mit klinischen Ergebnissen. [Wilke et al 1992-2000]

## ***6.4 Nachteile der humanen Knochenmark-Zellkultur***

Neben den beschriebenen Vorteilen dieses Modells darf man jedoch nicht die hohen Kosten außeracht lassen, die dazu führen, dass nur kleinere Versuchsdesigns durchgeführt werden können.

Allerdings sind alle Zellkulturverfahren, wie auch Tierversuche aufwendig und kostenintensiv. Zudem sind und waren die Tierversuche unter ethischen Gesichtspunkten nicht optimal geeignet. Die durch Tierversuche erhaltenen Ergebnisse lassen sich außerdem nur unter Vorbehalt auf den Menschen übertragen. Dies liegt zum großen Teil in den unterschiedlichen Reaktionsweisen der tierischen Zellen und zum anderen in den vom Menschen abweichenden immunpathologischen Prozessen.

## 6.5 Standardisierbarkeit

Um eine relativ hohe Standardisierbarkeit zu gewährleisten, wurden folgende Faktoren in diesem humanen Knochenmarkzellkulturmodell beachtet:

1. Es wurden Patienten im Alter zwischen 40 und 75 Jahren, die zur Knochenmarkspende vorgesehen waren, ausgewählt.
2. Diese Patienten hatten außer der Coxarthrose keine weiteren in der Anamnese auffälligen Vorerkrankungen.
3. Bei den Patienten wurde vor der Hüftgelenkersatzoperation eine Eigenblutspende durchgeführt, welche die serologische Testung des Patienten gewährleistet.
4. Der bei der Operation resezierte Hüftkopf wurde für die Knochenbank gespendet, was ebenfalls zur serologischen Testung des Patienten führt.
5. positives Votum der Ethikkommission

Durch Einhaltung dieser Kriterien ist gewährleistet, dass der ausgewählte Patient prinzipiell ein gesunder „nur“ mit einer Coxarthrose belasteter Mensch ist.

Daher sollten seine Zellen unter gleichbleibenden Zellkulturbedingungen unter einer gewissen Streubreite ähnliche Ergebnisse liefern, die sich dann auch bei anderen vergleichbaren Patientenpopulationen reproduzieren lassen können.

Diese Studie sowie auch eine weitere Studie mit Chrom-Cobalt-Partikeln beweisen durch ihre Ergebnisse die Standardisierbarkeit dieses Zellkulturmodells.[Wilke et al 2000]

Es zeigte sich, dass die humanen Knochenmarkzellkulturen, bei denen von vergleichbaren Patientenpopulationen immer auf die gleiche Art und Weise Knochenmark entnommen wurde und dieses immer auf dieselbe Art kultiviert wurde, in ihren Kontrollkulturen stets reproduzierbare Ergebnisse lieferten.[Wilke et al 1998]

## 6.6 Ausblick

Zwischenzeitlich wurden Versuche zur Vermeidung des TNF-alpha-Peaks von Partikel versetzten Makrophagenkulturen durch verschiedene Medikamente durchgeführt. Dadurch soll einer eventuellen aseptischen, frühzeitigen Lockerung entgegengewirkt werden. Die Arbeitsgruppe Rader und Mitarbeiter versetzte eine humane Makrophagen-ähnliche Zellkultur mit Abriebpartikeln (Polyethylen, Chrom, Cobalt, Titan, Aluminium-Keramik und Zirkonium-Dioxid) und ermittelte erhöhte TNF-a-Werte. Das Maximum an erhöhten TNF-a Werten fand sich bei einer Konzentration von  $80 \times 10^8$  Partikel. Bei der mit dieser Partikelkonzentration versetzten Kultur wurden verschiedene Medikamente in unterschiedlichen Dosen ausgetestet, um einen TNF-alpha Peak zu vermeiden. Bei einer empfohlenen Maximaldosis der Medikamente zeigte sich bei NSAR (nicht-steroidalen Antirheumatika) keine Abschwächung der TNF-alpha Freisetzung. Biphosphonate, Etidronate und Ibendronate dagegen führten zu einer Verminderung der TNF-alpha Sekretion. [Rader CP et al 2000]

Dieser Ansatz lässt aber eine Berücksichtigung des Interleukin-6- und Interleukin-1 $\beta$  - Peaks völlig außeracht.

Eine möglicherweise durchzuführende Testung von Medikamenten, die diese Zytokinexpression hemmen sollen, müssten auf alle drei Zytokine abgestimmt werden. Allerdings sollte man sich nicht nur auf die Zytokine konzentrieren. Sondern man sollte auch die durch diese Studie aufgestellte Hypothese, dass infolge einer Interferon- $\gamma$  Produktion durch die NKZ die Entzündungsreaktion getriggert und unterhalten werden kann, weiter verfolgen. Daher sollten Untersuchungen bezüglich der Differenzierung von NKZ aus T-Zellen und der Nachweis einer vermehrten Interferon- $\gamma$  Freisetzung erfolgen.

In nächster Zukunft werden verschiedene Studien zu diesem Thema in unserem Labor durchgeführt werden!

Des weiteren sollen Immunsuppressiva und NSAR auf ihre Wirksamkeit untersucht werden. Das Augenmerk sollte vor allem auf die Inhibition der Interleukin-6-und Interleukin-1-Freisetzung gelegt werden, da man bereits von der Potenz der IL-6 und IL-1 induzierten Osteolysen beim Krankheitsbild des Plasmozytoms weiß.

Das Krankheitsbild des Plasmozytoms ist durch einen massiven Verlust an Knochensubstanz gekennzeichnet. Dieser Knochenverlust stellt für diese Krankheit ein Hauptmerkmal dar. Der Knochenverlust führt zu Knochenschmerzen, möglichen Spontanfrakturen und kann auch Hypercalcämien bedingen. Die typischen Knochenläsionen bestehen charakteristischerweise lediglich aus einer osteolytischen Zone ohne jeglichen Nachweis von Knochenneubildung.

Durch eine Aktivierung von Osteoklasten kommt es zu einer Destruktion von Knochensubstanz. Die Aktivierung der Osteoklasten erfolgt auf parakrinem Wege, da aktivierte Osteoklasten immer in der Nähe von Myelomzellen gefunden werden. [Mundy et al GR 1974 a,b]

Das Hauptdiskussionsthema beim Plasmozytom besteht derzeit darin welche Faktoren und wie viele Faktoren für die Knochenresorption verantwortlich sind. Bisher wurde der Nachweis für drei Zytokine (Interleukin-1, Interleukin-6 und Lymphotoxin) erbracht. [Kawano M et al 1989, Garret IR et al 1987, Cozzolino F et al 1989].

Aufgrund der Ergebnisse der Zelldifferenzierung in unserer Studie ließ sich nur eine gering vermehrte Anzahl von CD-19 positiven Zellen (B-Lymphozyt) nachweisen. Primär sieht es daher nicht so aus als spiele der B-Lymphozyt eine wesentliche Rolle in der sogenannten „particle disease“. Es hat den Anschein, dass die natürliche Killerzelle und der Makrophage die entscheidenden Zellarten darstellen. In weiteren FACS-Analysen soll daher anhand von Aktivitätsmarkern gezeigt werden, ob es eventuell zu einer Änderung der Aktivität von CD-19 positiven Zellen kommt.[Wang JY 1996]



## ***VII. Zusammenfassung***

### **Fragestellung:**

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob zugesetzte Tivaniumpartikel zu einer signifikant erhöhten Freisetzung proinflammatorisch und osteolytisch wirkender Mediatoren führen und auf diesem Wege zu einer Lockerung von Endoprothesen beitragen können. Zusätzlich erfolgte eine FACS-Analyse zur Untersuchung, welche Zellen an der Zytokinfreisetzung hauptsächlich beteiligt sind.

Die humanen Knochenmarkzellkulturen wurden mit Tivanium-Abriebpartikeln in verschiedenen Konzentrationen versetzt, die den Konzentrationen entsprachen, welche im periartikulären Gewebe von aseptisch gelockerten Endoprothesen gefunden wurden ( $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ /ml). Der Untersuchungszeitraum wurde auf zwei Wochen nach Partikelzugabe festgesetzt.

### **Methodik:**

Anhand der standardisierten humanen Knochenmarkzellkultur wurde ein Zytokinprofil (Interleukin-6, Interleukin- $1\beta$  und Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ), sowie LDH über einen Zeitraum von zwei Wochen nach Partikelzugabe analysiert.

Bei sonst gesunden Patienten (nach durchgeführter Eigenblutspende; sowie vorgesehener Knochenmarkspende), mit einer Coxarthrose wurde, im Rahmen einer totalen Hüftgelenkendoprothese (Hüft-TEP) nach der Femurkopfosteotomie, Knochenmark steril aus dem proximalen Femurschaft entnommen (Ethikkommission des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg genehmigt AZ 44/99) und anschließend aufgearbeitet.

Im Rahmen der Hüft-TEP wurde ein spongiöser, markhaltiger Block von etwa 7 x 10 x 20mm entnommen und weiterverarbeitet.

Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des Casy-System gezählt. Eine Charakterisierung der Zellen erfolgte mit Hilfe der FACS-Analyse.

Nach der Auszählung wurden jeweils  $3 \times 10^6$  -  $3,5 \times 10^6$  Zellen pro well in der 6-well-Platte mit 2 ml IMDM ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 21 Tage kultiviert. Nach einer Woche hatten sich die Zellen (im Mittel:  $3,216 \times 10^6$  Zellen = 327.000 Zellen pro

cm<sup>2</sup>) am Boden der „well's“ abgesetzt. Nach dieser Woche wurden die sterilen Tivanium-Partikel (Sterilisation im Autoklaven) in verschiedenen Konzentrationen (10<sup>9</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup> pro ml Medium) hinzugegeben und der Mediumwechsel von nun an mit Zugabe von Wachstumsfaktoren begleitet. Zur Stimulation der Zellkultur wurden die rekombinanten Wachstumsfaktoren IL-3 und GM-CSF mit einer Konzentration von 10 ng / ml Medium verwendet.

Ein Teil der Kulturen blieb als Negativkontrolle ohne die Zugabe von Partikeln. Das Medium wurde anfangs alle 2 Tage gewechselt. Nach der ersten Woche wurden die Überstände gesammelt und sowohl in den Kontrollkulturen als auch in den partikelversetzten Kulturen an den Tagen 1, 3, 6, 8, 10, 14 nach der ersten Woche bzw. Partikelzugabe das Zytokinprofil und LDH bestimmt. Zur Unterscheidung, ob die Zugabe von Wachstumsfaktoren einen Einfluß auf die Zytokinfreisetzung besitzt, wurden humane Knochenmarkzellkulturen mit und ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren miteinander verglichen. Zusätzlich erfolgte am Tag der maximalen Zytokinexpression eine FACS-Analyse, um die an diesem Zeitpunkt vorherrschenden Zellarten zu identifizieren. Hierbei wurde vor allem Wert auf eine mögliche Änderung der Anzahl von B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten bei sonst konstanten Versuchsbedingungen in Abhängigkeit der Menge von Abriebpartikeln gelegt.

## **Ergebnisse:**

Beim 2. bis 4. Mediumwechsel der humanen Knochenmarkzellkultur zeigte sich ein konzentrationsabhängiger IL-6 Anstieg. Für die Partikelkonzentrationen von 10<sup>9</sup>, 10<sup>8</sup> und 10<sup>7</sup> pro ml Medium ergab sich ein Signifikanzniveau von p≤0,001, wobei das Maximum der IL-6-Freisetzung mit 20.000 pg/ml bei einer Konzentration von 10<sup>9</sup> Partikel pro ml Medium auf bis das 20-fache der Kontrollwerte anstieg. Für die Partikelkonzentration von 10<sup>6</sup> Partikeln pro ml Medium ergab sich ein Signifikanzniveau von p≤0,01.

Analog zur IL-6-Freisetzung zeigte sich auch bei der IL-1β-Sekretion am 2. bis 4. Mediumwechsel der humanen Knochenmarkzellkultur ein signifikanter Anstieg. Die IL-1β-Freisetzung wird hierbei allerdings nur durch die höchste Konzentration von 10<sup>9</sup>

Partikeln pro ml Medium stimuliert. Im Vergleich zu den Kontrollkulturen zeigt sich für die höchste Partikelkonzentration ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,01$ . Für die Partikelkonzentrationen von  $10^8$ ,  $10^7$  und  $10^6$  ließen sich keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollkultur ermitteln.

In der humanen Knochenmarkzellkultur zeigte sich auch für die TNF- $\alpha$  Freisetzung ein Anstieg am 3.Tag der Kultur. Nach Stimulation der Kultur mit Partikeln ergab sich ein Anstieg auf das 10-fache der Kontrollwerte für eine Partikelkonzentration von  $10^9$  pro ml Medium und für eine Konzentration von  $10^8$  Partikel pro ml Medium noch eine 5-fache Sekretionssteigerung. Das Signifikanzniveau lag bei  $p \leq 0,001$  für die Partikelkonzentrationen von  $10^9$  und  $10^6$  pro ml Medium. Die Konzentration von  $10^8$  und  $10^7$  pro ml Medium zeigten noch ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,01$ .

Als Zeichen der Zelltoxizität wurde die LDH-Aktivität bestimmt. Hierbei zeigt sich eine signifikant erhöhte Ausschüttung von LDH beim zweiten und dritten Mediumwechsel ( $p \leq 0,05$ ) für die maximale Partikelkonzentration von  $10^9$  Partikel pro ml Medium. Bei den anderen Partikelkonzentrationen ließ sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrollkultur ermitteln.

In der FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass es zu einer Zunahme von CD2-positiven Zellen (T-Zelle, NKZ) sowie der CD66b-positiven Zellen (Makrophagen) kam.

### **Diskussion:**

Die Studie zeigt auf der einen Seite, dass die Tivaniumpartikel mit einer Größe von  $\leq 1\mu\text{m}$  hinreichend klein sind, um biologische Effekte erzielen zu können. Zum anderen wird gezeigt, dass freigesetzte Tivaniumabriebpartikel über eine Veränderung der Zelldifferenzierung zu einer signifikanten Erhöhung der Freisetzung proinflammatorischer und osteolytisch wirkender Mediatoren führen und auf diese Art zu einer aseptischen Lockerung von Endoprothesen beitragen können. Die Unterschiede der Ergebnisse zu anderen Zellkulturmodellen lassen sich hauptsächlich durch das von uns gewählte humane Knochenmarkzellkulturmodell erklären. Das humane Knochenmark ist das Effektorgewebe von Abriebpartikeln, da der Prothesensitz „in situ“ im Knochenmark zu finden ist. Durch Kombination der Resultate von

Zytokinprofil und FACS-Analyse lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die natürliche Killerzelle mit großer Wahrscheinlichkeit die zentrale Rolle im System der partikel-induzierten Entzündungsreaktion einnimmt.

Schlüsselwörter: humane Knochenmarkzellkultur; Zytokine; Titan-Aluminium-Vanadium-Partikel

## *Abkürzungsverzeichnis*

Ak = Antikörper

BSA = bovines serum albumine

bzw. = beziehungsweise

Ca = Carcinom

CFU-F = colony forming unit-

CFU-GM = Colony-forming-unit granulocyte/macrophage

CNTF = ciliary neutrotrophic factor

CrCoMb = Chrom-Kobalt-Molybdenium

CT-1 = Cardiotropin 1

EDTA = ethylen diamine tetraacetic acid

ELISA = enzyme linked immunosorbent assay

Eo-CSF = Eosinophilen- Kolonie-stimulierender Faktor

EPO = Erythropoetin

Fa. = Firma

FACS = fluorescence activating cell sorter

FITC = Fluoreszeinisothiocyanat

FKS = fetales Kälberserum

G-CSF = Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor

GM-CSF = Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor

gp = Glycoprotein

h = Stunde

HS = Pferdeserum

Hüft-TEP = Hüft-Totalendoprothese

IFN = Interferon

Ig = Immunglobulin

IL = Interleukin

IMDM = Iscove's modified Dulbeccos Medium

JAKS = Janus-Kinasen

LDH = Laktatdehydrogenase

LIF = Leukämie-Inhibitor-Faktor

M = Molar

M-CSF = Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor

µg = Mikrogramm

µm = Mikrometer

ml = Milliliter

mm = Millimeter

Multi-CSF = Multi-Kolonie-stimulierender Faktor

NaHCO<sub>3</sub> = Natriumhydrogencarbonat

ng = nanogramm

NKZ = Natürliche Killerzellen

NSAR = nicht-steroidalen Antirheumatika

OCAF = osteoclast activating factor

OSF = osteoclast stimulating factor

OSM = Onkostatin M

PAF = Plättchen aktivierender Faktor

PBS = Phosphat buffered saline

pg = picogramm

PMMA = Polymethylmethacrylat

PTH = Parathormon

REM = Rasterelektronenmikroskop

STATs = signal transducers and activators of transcription

TBS = triphosphate buffered saline

TGF = transforming growth factor

Titanium = Titan 6 Aluminium 4 Vanadium

TNF-α = Tumornekrosefaktor-α

U = Umdrehung

UHMWPE = ultra-high molecular weight polyethylene

VitD<sub>3</sub> = Vitamin D<sub>3</sub>

# Anhang

Tabelle der Interleukin-6 Werte:

## 1. WECHSEL IL-6 WERTE (TAG 1)

10<sup>9</sup>                      10<sup>8</sup>                      10<sup>7</sup>                      10<sup>6</sup>

840		946		1038		744
960		880		870		788
1134		1158		916		898
296		1058		282		332
276		1124		316		448
224		988		324		448
972		1616		792		818
1292		1180		1232		888
984		556		1112		822
182		158		192		204
154		140		198		194
246		238		286		286
378		356		616		384
428		262		258		406
320		316		216		400

579,066667 pg/ml		731,73333 pg/ml		576,53333 pg/ml		537,33333 pg/ml	Mittelwert
398,7013681 pg/ml		466,52935 pg/ml		378,34864 pg/ml		257,50192 pg/ml	SW

## 2. Wechsel IL-6 Werte (TAG 3)

10<sup>9</sup>                      10<sup>8</sup>                      10<sup>7</sup>                      10<sup>6</sup>

>20000		5920		6420		1144
>20000		6180		5200		906
>20000		8600		5980		1006
>20000		6508		3580		1068
>20000		6840		4420		1500
>20000		6642		4280		1368
>20000		4780		3500		1522
>20000		4640		2560		1282
>20000		4480		4520		1076
19700		9870		4425		1065
>20000		9545		4352		1100
>20000		8650		4100		987
>20000		8200		3620		1096
>20000		4880		2160		1088
>20000		4600		2460		640

19980 pg/ml		6689 pg/ml		4105,1333 pg/ml		1291,2 pg/ml	Mittelwert
77,45966692 pg/ml		1876,9854 pg/ml		1203,9321 pg/ml		225,31254 pg/ml	SW

## 3. Wechsel IL-6 Werte (TAG 6)

10\*9

10\*8

10\*7

10\*6

>20000		3560		1040		674
>20000		3480		804		764
>20000		4220		768		540
10660		3756		824		462
9940		4028		694		371
8700		3542		1015		446
>20000		9940		200		420
>20000		7420		430		322
>20000		6320		318		284
11800		8524		2105		805
11400		8940		2564		941
6660		8520		1804		854
17562		730		1762		586
16825		916		792		564
18456		634		1308		502

15466,86667 pg/ml		4968,6667 pg/ml		1095,2 pg/ml		569 pg/ml	Mittelwert
4967,420556 pg/ml		3115,6821 pg/ml		683,74308 pg/ml		200,03857 pg/ml	SW

## 4. Wechsel IL-6 Werte (TAG 8)

10\*9

10\*8

10\*7

10\*6

8180		2040		494		376
6660		1370		318		520
7420		2780		446		412
4080		1988		817		841
8560		1570		883		757
5140		1608		982		920
5620		4760		304		342
6320		4100		164		432
3920		4140		316		340
10256		2584		851		456
9546		2016		879		512
9871		2010		920		487
6580		400		1024		316
4660		296		316		354
6060		362		268		304

6858,2 pg/ml		2134,9333 pg/ml		598,8 pg/ml		491,26667 pg/ml	Mittelwert
2061,85569 pg/ml		1367,1601 pg/ml		311,65714 pg/ml		194,95987 pg/ml	SW



5. Wechsel IL-6 Werte (TAG 10)  
10\*9 10\*8

10\*7

10\*6

4450		987		515		441
4360		1120		484		420
4400		1054		402		456
2515		504		296		371
2120		477		280		313
2874		482		343		392
4408		180		294		458
4200		198		310		380
3980		160		278		376
2740		638		662		446
2120		644		714		718
1970		532		606		710
3400		302		310		396
6480		310		320		270
3100		348		326		324

3541,133333 pg/ml		529,06667 pg/ml		409,33333 pg/ml		431,4 pg/ml	Mittelwert
1227,98865 pg/ml		312,26099 pg/ml		149,12012 pg/ml		126,85019 pg/ml	SW

6. Wechsel IL-6 Werte (TAG 14)  
10\*9 10\*8

10\*7

10\*6

4106		654		450		387
4100		980		398		390
4058		758		411		441
1335		342		281		298
1049		354		272		330
1120		480		322		262
4600		210		260		320
4426		198		246		318
4200		160		278		376
1200		368		462		260
937		516		412		522
1048		612		520		462
2040		1290		1110		1234
1934		1424		1080		1288
1102		1542		1462		2120

2483,66667 pg/ml		659,2 pg/ml		530,93333 pg/ml		600,53333 pg/ml	Mittelwert
1527,52679 pg/ml		452,92371 pg/ml		373,50014 pg/ml		529,66443 pg/ml	SW

Tabellen der IL-1 $\beta$  Werte:1. Wechsel IL-1 $\beta$  (TAG 1)  
Werte

10 <sup>9</sup>		10 <sup>8</sup>		10 <sup>7</sup>		10 <sup>6</sup>
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5,7		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
12,7		8,6		<5		10,2
12,1		<5		<5		<5

5,888888889 pg/ml		5,2 pg/ml		<5 pg/ml		5,288888888 pg/ml	Mittelw.
2,379047978 pg/ml		0,848528137 pg/ml		0 pg/ml		1,225651754 pg/ml	SW

2. Wechsel IL-1 $\beta$  (TAG 3)  
Werte

10 <sup>9</sup>		10 <sup>8</sup>		10 <sup>7</sup>		10 <sup>6</sup>
588		<5		<5		<5
461		<5		<5		<5
566		<5		<5		<5
14,5		<5		<5		<5
38,9		<5		<5		<5
20,5		<5		<5		<5
282		<5		<5		<5
33<5		<5		<5		<5
311		<5		<5		<5
749		<5		<5		<5
528		<5		<5		<5
432		<5		<5		<5
438		<5		<5		<5
401		<5		<5		<5
378		<5		<5		<5
136		<5		<5		<5
192		<5		<5		<5
148		<5		<5		<5

334,3833333 pg/ml		<5 pg/ml		<5 pg/ml		<5 pg/ml	Mittelw.
210,8549634 pg/ml		0 pg/ml		0 pg/ml		0 pg/ml	SW

3. Wechsel IL-1 $\beta$  (TAG 6)

Werte

10<sup>9</sup>10<sup>8</sup>10<sup>7</sup>10<sup>6</sup>

57,5		<5		<5		<5
62,4		<5		<5		<5
55,4		<5		<5		<5
9,2		<5		<5		<5
17,7		<5		<5		<5
12,3		<5		<5		<5
105		<5		<5		<5
74,9		<5		<5		<5
104		<5		<5		<5
193		<5		<5		<5
217		<5		<5		<5
139		<5		<5		<5
121		<5		<5		<5
115		<5		<5		<5
104		<5		<5		<5
164		<5		9,1		<5
159		<5		<5		<5
134		<5		<5		<5

102,4666667 pg/ml		<5 pg/ml		5,22777778 pg/ml		<5 pg/ml	Mittelw.
60,27089826 pg/ml		0 pg/ml		0,966379268 pg/ml		0 pg/ml	SW

4. Wechsel IL-1 $\beta$  (TAG 8)

Werte

10<sup>9</sup>10<sup>8</sup>10<sup>7</sup>10<sup>6</sup>

11,9		<5		<5		<5
7,7		<5		<5		<5
10		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
19,3		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
26,4		<5		<5		<5
17,3		<5		<5		<5
20,7		<5		<5		<5
64,1		<5		<5		<5
71		<5		<5		<5
37,8		<5		<5		<5
56		<5		<5		<5
49		<5		<5		<5
52		<5		<5		<5
42,2		<5		<5		<5
17,7		<5		<5		<5
21,4		<5		<5		<5

29,69444444 pg/ml		<5 pg/ml		<5 pg/ml		<5 pg/ml	Mittelw.
21,21069298 pg/ml		0 pg/ml		0 pg/ml		0 pg/ml	SW

5. Wechsel IL-1 $\beta$  (TAG 10)

Werte

10<sup>9</sup>10<sup>8</sup>10<sup>7</sup>10<sup>6</sup>

<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
6		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
34,1		<5		<5		<5
56		<5		<5		<5
39,4		<5		<5		<5
38,8		<5		<5		<5
38		<5		<5		<5
39,4		<5		<5		<5
25,7		<5		<5		<5
10,5		<5		<5		<5
10,7		<5		<5		<5

18,81111111 pg/ml		<5 pg/ml		<5 pg/ml		<5 pg/ml	Mittelw.
17,32858532 pg/ml		0 pg/ml		0 pg/ml		0 pg/ml	SW

6. Wechsel IL-1 $\beta$  (TAG 14)

Werte

10<sup>9</sup>10<sup>8</sup>10<sup>7</sup>10<sup>6</sup>

<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
16,8		<5		<5		<5
16		<5		<5		<5
17,1		<5		<5		<5
23,6		<5		<5		<5
14,9		<5		<5		<5
20,3		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
<5		<5		<5		<5
12,4		11,3		<5		<5

9,78333333 pg/ml		5,35 pg/ml		<5 pg/ml		<5 pg/ml	Mittelw.
6,542283286 pg/ml		1,48492424 pg/ml		0 pg/ml		0 pg/ml	SW

## Tabellen der TNF-alpha Werte:

## 1. Wechsel TNF-alpha (TAG 1)

Werte

10*9	10*8	10*7	10*6
12,1	15,8	8,9	12,9
13,8	17,1	11,1	17,5
17	15,4	14,6	16,3
9,7	7,6	10,7	11
11,7	6,3	11,9	8,5
10,7	7,1	12,6	11,4
19,6	22,1	14,3	16,6
10,5	15,5	18,1	17,7
21,3	14,8	19	13,9
19,3	19,9	22,3	19,6
19,1	16,3	22	20,6
20	22	23,1	18,1
9,1	12	9,5	11,7
11	10,6	10,1	9,8
4	10	8,3	7,2
14,1	6,1	16,5	10,9
11,4	12,8	13,9	15,2
12,6	11,7	12,5	12,7

13,72222222 pg/ml	13,505556 pg/ml	14,411111 pg/ml	13,977778 pg/ml	Mittelw.
4,694622149 pg/ml	5,0384956 pg/ml	4,7468738 pg/ml	3,9021194 pg/ml	SW

## 2. Wechsel TNF-alpha (TAG 3)

Werte

10*9	10*8	10*7	10*6
220	56	119	31,9
199	94,4	119	54,3
200	102	117	46,9
92,7	8,5	61,2	25,1
127	10,2	76,8	37,4
109	8,5	89	32,4
78,4	28,9	44,7	25,2
67	50,5	41,7	33,6
77,3	39,5	41,4	33,7
103	43	44,6	34,9
74	46,6	34	35,4
75,3	40,1	45,8	36,2
99	38,7	21,5	19,8
125	29,4	25,5	21,4
100	35,1	20,1	21,1
132	121	55,1	28,3
136	72,7	47	27,5
161	58,2	45,7	27,7

120,8722222 pg/ml	49,072222 pg/ml	58,283333 pg/ml	31,822222 pg/ml	Mittelw.
46,81348229 pg/ml	31,470132 pg/ml	32,516408 pg/ml	8,8031115 pg/ml	SW

## 3. Wechsel TNF-alpha (TAG 6)

Werte

10\*9

10\*8

10\*7

10\*6

37,7		33,5		42,7		27,9
32,9		32,1		37,8		30
30,2		37,3		35		32,9
36,6		6,7		18,5		15,3
35,7		6,1		25,5		17,3
36,3		5,5		28,2		18,8
46		38,7		19,3		17
41,8		29,7		19,8		14,1
44,4		26,9		20,6		14,1
41,7		11,6		19,9		16,5
42,7		19,9		19,3		15
33,5		14,7		17,6		15,6
39,7		19,5		19,1		17
41		18,9		18,5		17,4
40,3		19		21		16,6
41,6		15,9		27,3		17
45,3		18,9		15,7		16,9
40,1		11,5		23,4		19,9

39,3055556 pg/ml		20,355556 pg/ml		23,844444 pg/ml		18,85 pg/ml	Mittelwert
4,403671225 pg/ml		10,54069 pg/ml		7,6133955 pg/ml		5,5147129 pg/ml	SW

## 4. Wechsel TNF-alpha (TAG 8)

Werte

10\*9

10\*8

10\*7

10\*6

23,2		33,6		34,2		30,5
17,8		36,2		30		27,5
20,1		33,4		28,7		28,8
32,1		7,4		19,8		17,5
27,5		7,8		18,5		9,8
29,2		8,2		18,4		18,3
21,3		22		16,1		10,2
22,4		17,3		16,6		14,1
21,8		19,9		14,3		18,7
19,3		18,1		22		18,3
23,3		22,1		21,9		18,8
15,8		23,7		19,1		15,1
21,8		19,5		19		18,3
22,3		21,2		18,7		18,5
19,6		20		17,9		18,1
23,4		15,7		22,2		19
19,7		6		19,8		11,1
24,3		15,8		17,6		15,7

22,4944444 pg/ml		19,327778 pg/ml		20,822222 pg/ml		18,238889 pg/ml	Mittelwert
3,977358305 pg/ml		8,853368 pg/ml		5,175912 pg/ml		5,7885423 pg/ml	SW

## 5. Wechsel TNF-alpha (TAG 10)

Werte

10\*9

10\*8

10\*7

10\*6

44		58,7		55,2		45,7
49,2		54,1		61,5		50,5
45,1		53,7		58,3		67,6
24,1		19,1		18,7		21,2
22,5		20		19,5		22
18,9		19,8		15,4		19,8
25,1		19,3		16,7		16,4
34,1		17,5		19,1		16,5
36,1		19,7		14,4		10,4
19,1		18,5		16,5		18,1
19,7		17,2		16,1		21
16,8		16,8		16,5		15,4
17,9		25,8		20,7		22,7
13,3		19,1		19,6		18,2
10,6		13,6		20,3		20,1
20,8		22,7		22		22,5
36,9		26,4		18,3		20,3
21,8		27,3		21,5		21,1

26,44444444 pg/ml		26,072222 pg/ml		25,016667 pg/ml		24,972222 pg/ml	Mittelwert
11,52410375 pg/ml		14,011458 pg/ml		15,512661 pg/ml		14,508002 pg/ml	SW

## 6. Wechsel TNF-alpha (TAG 14)

Werte

10\*9

10\*8

10\*7

10\*6

22		20,8		22		21,2
24,1		20		22,5		22,7
22,7		21,5		21,5		20,3
18		16,5		16,8		16,1
17,6		17,1		16		18
14,5		17,5		16,5		14,9
18,5		13,3		17,3		12
24,4		16,5		14,4		16,5
21,2		20,7		13,7		14,5
18		19,1		17,1		16,5
18,1		18,7		15,6		16,1
16,9		19		16,1		15,8
14,4		17,5		16,8		22,2
12,1		19,2		19,5		18
17,6		15,6		15,3		18,3
17,1		18,5		15,8		12,6
18,6		16		20		16,5
15,8		15,8		9,6		15,8

18,42222222 pg/ml		17,961111 pg/ml		17,027778 pg/ml		17,111111 pg/ml	Mittelwert
3,352883843 pg/ml		2,1453476 pg/ml		3,1778286 pg/ml		2,9881903 pg/ml	SW

## Tabellen der LDH-Aktivität:

## 1. Wechsel LDH Aktivität (TAG 1)

10\*9                      10\*8                      10\*7                      10\*6

45		39		38		44
42		38		38		40
43		37		39		38
43		45		47		46
44		37		45		43
46		41		44		45
34		52		41		53
30		36		33		30
28		36		38		30
76		53		44		52
59		40		42		33
67		51		61		53
42		47		45		50
43		47		47		54
45		46		48		53
46		42		46		51
48		39		42		38
42		46		40		36

45,7222222 U/L		42,888889 U/L		43,222222 U/L		43,833333 U/L	Mittelwert
11,67604665 U/L		5,6348588 U/L		5,9661354 U/L		8,2693623 U/L	SW

## 2. Wechsel LDH Aktivität (TAG 3)

10\*9                      10\*8                      10\*7                      10\*6

157		33		37		32
189		32		34		33
177		37		30		38
39		27		29		32
38		20		31		39
46		27		33		34
70		21		27		43
67		28		19		29
57		22		46		31
78		38		54		45
55		27		41		50
85		42		48		43
368		40		37		39
374		39		38		40
366		40		36		41
221		26		32		41
186		31		34		38
170		30		30		31

152,388889 U/L		31,111111 U/L		35,333333 U/L		37,722222 U/L	Mittelwert
116,1495683 U/L		6,9526879 U/L		8,1889452 U/L		5,7271855 U/L	SW



## 3. Wechsel LDH Aktivität (TAG 6)

10\*9                      10\*8                      10\*7                      10\*6

338		47		42		65
353		48		37		39
342		60		40		78
79		36		32		35
97		26		43		34
91		32		37		31
193		35		35		31
69		35		36		28
52		33		32		32
272		42		42		49
225		41		44		49
227		43		43		48
87		49		44		43
100		47		46		40
109		46		53		41
111		41		41		39
121		35		35		38
100		34		37		39

164,7777778 U/l		40,555556 U/l		39,944444 U/l		42,166667 U/l	Mittelwert
102,4066608 U/l		8,1328833 U/l		5,3409872 U/l		12,505293 U/l	SW

## 4. Wechsel LDH Aktivität (TAG 8)

10\*9                      10\*8                      10\*7                      10\*6

112		41		31		41
114		38		37		35
127		37		37		35
79		27		31		49
33		28		31		32
70		28		31		38
93		35		37		36
85		32		34		32
78		32		34		34
61		42		44		39
68		41		28		43
88		43		42		42
51		68		56		51
51		68		56		53
51		68		65		62
76		51		40		41
70		38		31		36
69		40		45		48

76,4444444 U/l		42,055556 U/l		39,444444 U/l		41,5 U/l	Mittelwert
24,25167604 U/l		13,37017 U/l		10,359549 U/l		8,2050917 U/l	SW

## 5. Wechsel LDH Aktivität (TAG 10)

10\*9                      10\*8                      10\*7                      10\*6

64		50		46		47
70		58		47		45
77		54		48		60
86		43		41		47
82		42		41		48
44		43		45		48
58		43		41		44
53		42		42		42
51		40		44		41
39		56		65		54
38		58		66		54
43		61		61		53
65		47		50		48
52		39		44		50
72		46		49		49
57		46		42		48
49		41		42		43
51		42		43		46

58,3888889 U/l		47,277778 U/l		47,611111 U/l		48,166667 U/l	Mittelwert
14,48382014 U/l		7,0694501 U/l		8,0814886 U/l		4,7681542 U/l	SW

## 6. Wechsel LDH Aktivität (TAG 14)

10\*9                      10\*8                      10\*7                      10\*6

82		62		64		55
70		49		48		59
56		54		56		60
48		50		50		49
45		51		51		48
51		42		46		48
36		46		46		46
46		48		43		42
37		49		41		43
51		45		31		41
42		46		35		40
43		45		46		39
43		47		46		47
49		43		49		46
46		41		48		48
46		42		42		49
51		46		43		49
50		46		43		50

49,5555556 U/l		47,333333 U/l		46 U/l		47,722222 U/l	Mittelwert
11,01988695 U/l		4,9705012 U/l		7,2598817 U/l		5,8591864 U/l	SW

### **FACS- Analyse Nr.1**

Gate 1     vitale Zelle				Gate 2     Zellreste			
FL-1: grün		FL-2: rot		FL-1: grün		FL-2: rot	
?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean

10 <sup>9</sup> P/ml	Negativkontrolle	All	15,68	3,51	15,68	3,71	69,91	11,96	69,91	12,75
		M1	14,11	3,74	12,47	4,34	69,25	11,74	69,42	12,58
	CD14 / CD2	All	14,92	3,9	14,92	688,1	73,04	17,32	73,04	151,7
		M1	10,45	4,21	4,41	11,31	71,31	15,59	70,28	121,3
		M2			10,11	1011				
		M3			14,69	698,9				
	CD19 / CD34	All	12,93	5,32	12,93	53,1	76,54	15,71	76,54	117
		M1	11,69	5,59	11,07	6,62	75,53	14,35	76,31	117,4
	CD66b	All	11,35	14,31	11,35	4,53	78,63	426,35	78,63	40,39
		M1	11,05	11,84	9,77	5,09	55,77	587,49	78,35	40,34

Gate 1      vitale Zelle				Gate 2      Zellreste			
FL-1: grün		FL-2: rot		FL-1: grün		FL-2: rot	
?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean

10 <sup>8</sup> P/ml	Negativkontrolle	All	9,72	3,4	9,72	3,49	78,8	15,93	78,8	19,27
		M1	9	3,53	7,52	4,07	78,33	15,14	78,18	18,34
	CD14 / CD2	All	13,34	5,11	13,34	617	74,6	136,85	74,6	135
		M1	10,54	5,43	9,65	847,5	68,49	16,7	74,27	133,8
		M2			13,12	627,3				
	CD19 / CD34	All	12,88	5,94	12,88	75,33	75,94	18,26	75,94	94,76
		M1	11,59	5,65	11,07	6,47	75,31	18,41	75,8	92,03
		M2							72,63	30,34
	CD66b	All	13,35	10,05	13,35	3,83	75,59	411,89	75,59	44,53
		M1	12,93	10	11,33	4,26	75,04	414,9	75,11	44,38

Gate 1 vitale Zelle			
FL-1: grün		FL-2: rot	
?: total	mean	?: total	mean

Gate 2 Zellreste			
FL-1: grün		FL-2: rot	
?: total	mean	?: total	mean

10 <sup>7</sup> P/ml	Negativkontrolle	All	19,36	3,33	19,36	3,31	68,11	13,93	68,11	15,6
		M1	17,46	3,58	14,91	3,95	67,75	13,38	67,62	14,9
	CD14 / CD2	All	20,44	3,31	20,44	489,2	67,77	45,97	67,77	180,9
		M1	14,45	4,11	20,14	496,5	67,52	43,8	67,27	180,5
		M2			14,71	674				
	CD19 / CD34	All	19,94	10,39	19,94	39,04	69,09	19,22	69,09	129,9
		M1	15,68	3,79	17,71	6,22	68,1	16,71	68,98	121,1
		M2	2,43	59,34	18,17	42,74			65,53	28,94
		M3	18,37	11,19						
	CD66b	All	19,55	9,37	19,55	3,57	68,34	622,62	68,34	54,36
		M1	19,12	8,91	16,28	4,08	57,72	732,58	68,2	54,47
		M2					9,92	23,74		

Gate 1      vitale Zelle				Gate 2      Zellreste			
FL-1: grün		FL-2: rot		FL-1: grün		FL-2: rot	
?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean

10° P/ml	Negativkontrolle	All	15,99	3,3	15,99	3,21	75,18	15,64	75,18	17,87
		M1	14,32	3,42	13,05	3,7	74,78	15,08	74,97	17,71
	CD14 / CD2	All	17,69	4,33	17,69	507,9	73,64	120,87	73,64	233,3
		M1	13,79	4,26	13,4	666,4	73,74	119,48	73,56	233,6
		M2			17,58	511	67,2	22,67		
	CD19 / CD34	All	16,94	8,92	16,94	37,41	74,22	18,91	74,22	82,55
		M1	15,28	9,77	15,18	41,63	73,34	17,13	74,17	82,6
		M2	13,31	3,39	14,65	5,56			72,19	32
	CD66b	All	17,64	9,14	17,64	3,45	72,14	555,56	72,14	52,64
		M1	17,33	8,98	14,82	3,87	55,99	703,6	71,88	52,37

### **FACS- Analyse Nr.2**

Gate 1      vitale Zelle				Gate 2      Zellreste			
FL-1: grün		FL-2: rot		FL-1: grün		FL-2: rot	
%: total	mean	%: total	mean	%: total	mean	%: total	mean

10 <sup>9</sup> P/ml	Negativkontrolle	All	14,61	3,44	14,61	3,57	70,52	12	70,52	12,01	x
		M1	13,95	3,16	13,74	4,2	69,25	10,74	69	12,66	
	CD14 / CD2	All	14,34	3,9	14,34	640,3	54,5	16,85	54,5	110,3	
		M1	11,21	4,25	11,65	898,9	47,69	15,59	64,99	87,88	
		M2									
		M3									
	CD19 / CD34	All	11,93	5,46	11,93	47,68	70,2	14,58	70,2	100	
		M1	11,16	5,51	11,98	12,65	64,52	14,01	77	99,7	
	CD66b	All	11,1	13,36	11,1	3,33	83,25	389,5	83,25	25,9	
		M1	11,05	10,8	10,56	4,75	59,67	512,36	78,42	25,64	

Gate 1 vitale Zelle			
FL-1: grün		FL-2: rot	
?: total	mean	?: total	mean

Gate 2 Zellreste			
FL-1: grün		FL-2: rot	
?: total	mean	?: total	mean

10 <sup>8</sup> P/ml	Negativkontrolle	All	8,56	3,1	8,56	3,2	79,12	14,62	79,12	16,77
		M1	8	3,02	7,23	4	78,33	14,02	77,97	14,2
	CD14 / CD2	All	12,01	5,1	12,01	657,5	67,54	133,33	67,54	101,6
		M1	10,54	5,96	9,66	789,9	66,6	47,11	69,46	99,5
		M2			12,96	630,1				
	CD19 / CD34	All	11,88	5,99	11,88	59,93	69,87	18,01	69,87	81,25
		M1	11,57	5,66	11,07	7,65	66,91	15,23	75,8	72,05
		M2							71,25	39,6
	CD66b	All	13,25	10,02	13,25	2,96	75,01	399,99	75,01	44,3
		M1	12,91	8,75	11,2	3,01	75	401,1	75,11	42,77



Gate 1 vitale Zelle			
FL-1: grün		FL-2: rot	
%: total	mean	%: total	mean

Gate 2 Zellreste			
FL-1: grün		FL-2: rot	
%: total	mean	%: total	mean

Gate 3 Zellreste			
FL-1: grün		FL-2: rot	
%: total	mean	%: total	mean

10 <sup>7</sup> /ml	Negativkontrolle	All	10,14	4,36	10,14	4,73	7,43	15,52	7,43	14,51	46,15	14,68	46,15	13,6
		M1	8,92	3,11	9,75	2,99	7,14	15,48	7,22	14,15	43,28	13,47	45,37	13,3
	CD14 / CD2	All	9,99	39,35	9,99	406,4	8,41	236,3	8,41	87,9	44,39	453,2	44,39	79,7
		M1	8,56	15,83	2,43	26,73	5,11	56,61	8,08	74,2	43,26	408	41,99	68,1
		M2			6,3	601,4					25,06	645,3		
	CD19 / CD34	All	9,23	31,79	9,23	126,4	8,36	44,26	8,36	301	47,04	39,22	47,04	242
		M1	5,59	11,69	7,61	82,32	7,54	36,94	7,9	265,8	45,64	36,01	44,73	235
		M2	2,21	85,5										
	CD66b	All	10,22	28,37	10,22	6,22	5,59	786,8	5,59	36,8	42,45	1185	42,45	42,7
		M1	8,01	8,73	9,72	3,63	1,48	32,68	5,5	36,15	34,39	1383	39,71	43,6
		M2					3,28	1268						

Gate 1 vitale Zelle			
FL-1: grün		FL-2: rot	
%: total	mean	%: total	mean

Gate 2 Zellreste			
FL-1: grün		FL-2: rot	
%: total	mean	%: total	mean

Gate 3 Zellreste			
FL-1: grün		FL-2: rot	
%: total	mean	%: total	mean

10 <sup>6</sup> P/ml	Negativkontrolle	All	8,97	4,22	8,97	4,27	6,83	18,79	6,83	22,09	45,76	16,39	45,76	18,9
		M1	8,12	3,4	8,11	3,96	6,44	15,67	6,48	16,89	42,18	11,95	41,67	13
	CD14 / CD2	All	7,98	39,74	7,98	441,3	6,35	551,9	6,35	106,5	49,26	238	49,26	61,6
		M1	6,64	13,49	1,75	27,93	4,59	38,42	5,4	59,47	33,76	34,12	47,09	48,9
		M2			5,43	613,1					11,38	382		
	CD19 / CD34	All	8,52	47,45	8,52	165,3	5,56	57,56	5,56	349,8	52,69	35,87	52,69	205
		M1	5,03	12,55	7,04	79,27	4,66	35,77	4,7	276	49,73	28,82	50,08	184
		M2	2,29	90,68										
	CD66b	All	8,93	21,15	8,93	5,16	3,73	394,7	3,73	35,97	47,14	841,2	47,14	37,2
		M1	7,39	9,46	8,6	3,9	2,02	40,95	3,5	30,12	41,99	920,1	44,38	34,1

### **FACS- Analyse Nr.3**

Gate 1      vitale Zelle				Gate 2      Zellreste			
FL-1: grün		FL-2: rot		FL-1: grün		FL-2: rot	
%: total	mean	%: total	mean	%: total	mean	%: total	mean

10 <sup>9</sup> P/ml	Negativkontrolle	All	14,01	3,37	14,01	3,66	60,56	11,62	60,56	12,05	x
		M1	13,97	3,61	13,17	4,26	61,25	11,33	66	12,66	
	CD14 / CD2	All	14,52	3,72	14,52	650,78	50,38	16,85	70,14	101,6	
		M1	12,79	3,66	12,6	710,65	48,89	15,54	70,08	88,78	
		M2									
		M3									
	CD19 / CD34	All	11,6	5,44	11,6	51,26	71,04	14,52	71,04	110	
		M1	11,59	5,26	11,67	13,25	67,59	13,97	74,1	100,7	
	CD66b	All	12,56	13,76	12,56	4,28	82,36	388,88	82,36	29,5	
		M1	12,01	11,52	10,01	4,12	79,98	489,45	78,44	26,54	

Gate 1      vitale Zelle				Gate 2      Zellreste			
FL-1: grün		FL-2: rot		FL-1: grün		FL-2: rot	
?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean

10 <sup>8</sup> P/ml	Negativkontrolle	All	7,92	3,4	7,92	3,48	79,21	15,39	79,21	17,92
		M1	7	3,35	7,25	401	73,83	15,41	71,88	14,83
	CD14 / CD2	All	14,33	5,1	14,33	675	65,74	138,65	65,74	120,65
		M1	10,45	5,34	9,62	799,26	65,6	17,6	72,47	115,62
		M2			11,23	627,5				
	CD19 / CD34	All	12,28	5,49	12,28	76,23	68,97	16,28	68,97	82,81
		M1	11,95	5,56	11,7	7,46	66,19	14,84	78,5	75,2
		M2							76,27	36,9
	CD66b	All	13,63	10,5	13,63	3,85	70,01	418,91	70,01	44,2
		M1	13,92	10	11,23	4,62	70	419,4	71,15	40,13

Gate 1      vitale Zelle				Gate 2      Zellreste			
FL-1: grün		FL-2: rot		FL-1: grün		FL-2: rot	
?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean

10 <sup>7</sup> /ml	Negativkontrolle	All	16,39	3,75	16,39	4,1	55,67	13,68	55,67	16,6
		M1	10,25	3,54	14,78	4,05	50,2	12,37	55,26	14,3
	CD14 / CD2	All	15,21	3,66	15,21	477,77	66,68	97,56	66,68	120,36
		M1	11,68	3,6	15	401,5	57,8	90,25	61,17	120,3
		M2								
	CD19 / CD34	All	15,65	18,25	15,65	75,66	69	20,11	69	147,74
		M1	13,28	16,25	12,55	70,15	61,8	20,56	49,98	121
		M2								
	CD66b	All	14,57	12,97	14,57	5,41	63,48	788,98	63,48	47,76
		M1	11,25	8,5	8,88	5,33	52,77	36,33	48,45	44,47
		M2					9,29	911,25		

Gate 1 vitale Zelle				Gate 2 Zellreste			
FL-1: grün		FL-2: rot		FL-1: grün		FL-2: rot	
?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean

10° P/ml	Negativkontrolle	All	12,99	3,7	12,99	3,7	75,2	15,6	75,2	17,7
		M1	12,32	3,4	12,88	3,33	69,52	15,08	74,79	11,78
	CD14 / CD2	All	11,98	10,66	11,98	511,0	73,5	120	73,5	233,3
		M1	11,64	10,25	12,57	500,26	50,88	119,10	75,63	213,68
		M2					36,64	66,31		
	CD19 / CD34	All	12,51	9,8	12,51	41,6	73,5	19	73,5	82,6
		M1	10,07	9,45	14,89	37,74	72,42	17,31	72,17	82,56
		M2	6,3	3,77	14,65	6,65			71,29	41,75
	CD66b	All	11,93	9,1	11,93	4	72,1	556,6	72,1	52,6
		M1	10,33	8,88	14,6	3,89	59,69	603,36	70,88	52,33

**FACS-**  
**Analyse Nr.4**

Gate 1      vitale Zelle				Gate 2      Zellreste			
FL-1: grün		FL-2: rot		FL-1: grün		FL-2: rot	
%: total	mean	%: total	mean	%: total	mean	%: total	mean

10 <sup>9</sup> P/ml	Negativkontrolle	All	14	3,1	14	3,55	61,02	13,36	61,02	12,0	x
		M1	13,8	3,61	13,1	4,21	61,01	12,33	66,05	11,66	
	CD14 / CD2	All	14,22	3,5	14,22	666,51	50,75	15,85	50,75	103,6	
		M1	12,71	3,46	12,6	610,5	48,9	15,45	70,28	98,78	
		M2									
		M3									
	CD19 / CD34	All	12,6	5,36	12,6	49,63	71,34	13,25	71,34	120	
		M1	11,59	5,12	11,95	19,25	69,59	13,17	72,1	101,7	
	CD66b	All	13,56	14,01	13,56	3,56	80,36	489,45	80,36	28,56	
		M1	13,01	12,59	11,1	3,02	79,98	433,36	76,44	26,45	

Gate 1 vitale Zelle				Gate 2 Zellreste			
FL-1: grün		FL-2: rot		FL-1: grün		FL-2: rot	
?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean

10 <sup>8</sup> P/ml	Negativkontrolle	All	7,29	3,4	7,29	3,44	78,25	12,39	78,25	17,1
		M1	7,1	3,32	7,89	3,17	71,68	12,21	78,11	13,69
	CD14 / CD2	All	13,44	5,01	13,44	599,68	66,25	122,68	66,25	120,65
		M1	11,54	4,34	6,92	555	65,6	68,6	72,74	111,15
		M2								
	CD19 / CD34	All	12,82	5,94	12,82	72,18	68,79	12,68	68,79	88,21
		M1	11,59	5,65	17,1	55,9	67,91	12,84	70,01	81,2
		M2								
	CD66b	All	13,33	12,69	13,33	3,64	70	422,69	70	39,6
		M1	13,01	12,23	12,28	3,45	69,91	387,85	74,26	32,11



Gate 1      vitale Zelle				Gate 2      Zellreste			
FL-1: grün		FL-2: rot		FL-1: grün		FL-2: rot	
?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean

10 <sup>7</sup> /ml	Negativkontrolle	All	18,36	3,46	18,36	3,36	69,11	13,99	69,11	14,99
		M1	17	3,4	16,39	3,41	67,75	12,22	68	14,05
	CD14 / CD2	All	20,01	3,33	20,01	426,97	67,78	46,6	67,78	156,66
		M1	12,26	3,1	20,01	400,15	67,05	46,5	68,99	150,22
		M2								
	CD19 / CD34	All	18,8	12,25	18,8	41,05	69,25	18,77	69,25	120,68
		M1	18,,55	11,15	20,4	33,36	68,88	18,47	67,62	11,1
		M2								
	CD66b	All	18,55	9,33	18,55	3,46	69,09	601,51	69,09	55,63
		M1	18,0	6,58	18,67	3,25	58,57	578,87	68,06	54,74
		M2								

Gate 1      vitale Zelle				Gate 2      Zellreste			
FL-1: grün		FL-2: rot		FL-1: grün		FL-2: rot	
?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean	?: total	mean

10° P/ml	Negativkontrolle	All	13,01	4,77	13,01	3,4	77,52	16,5	77,52	15,77
		M1	12,99	3,68	11,48	3,33	70,1	15,82	74,01	11,88
	CD14 / CD2	All	11,58	11,26	11,58	527,7	75,3	111,67	75,3	211,11
		M1	11,64	10,66	10,25	489,57	58,89	111,01	75,62	200,66
		M2								
	CD19 / CD34	All	12,15	9,1	12,15	33,9	72,22	17,59	72,22	80,81
		M1	11,70	8,87	12,19	28,54	70,08	17,33	70,29	70,18
		M2								
	CD66b	All	13,91	7,49	13,91	3,99	71,22	611,59	71,22	56,26
		M1	13,31	7,05	14,1	2,8	69,81	599,99	70,86	55,5

## ***Literaturverzeichnis***

**Abbas AK, Lichtmann HHT, Pober JS.**

Cellular and Molecular Immunology.

2<sup>nd</sup> Saunders (1993), Philadelphia.

**Adams JC.**

A reconstruction of cup arthroplasty of the hip.

J Bone Joint surg 1953; 35B:199.

**Agins HJ, Alcock NW, Bansal M, Salvati EA, Wilson PD Jr, Pellicci PM, Bullough PG.**

Metallic wear in failed titanium-alloy total hip replacements. A histological and quantitative analysis.

J Bone Joint Surg Am. 1988 Mar;70(3):347-56.

**al-Humidan A, Ralston SH, Hughes DE, Chapman K, Aarden L, Russell RG, Gowen M.**

Interleukin-6 does not stimulate bone resorption in neonatal mouse calvariae.

J Bone Miner Res. 1991 Jan;6(1):3-8.

**Anderson R.**

Femoral head.

Tower Company Bulletin, Seattle.

**Andrew JG, Hoyland J, Andrew SM, Freemont AJ, Marsh D.**

Demonstration of TGF-beta 1 mRNA by in situ hybridization in normal human fracture healing.

Calcif Tissue Int. 1993 Feb;52(2):74-8.

**Andrew JG, Hoyland J, Freemont AJ, Marsh D.**

Insulinlike growth factor gene expression in human fracture callus.  
Calcif Tissue Int. 1993 Aug;53(2):97-102.

**Aufdemorte TB, Fox WC, Holt GR, McGuff HS, Ammann AJ, Beck LS.**

An intraosseous device for studies of bone-healing. The effect of transforming growth-factor beta.

J Bone Joint Surg Am. 1992 Sep;74(8):1153-61.

**Ausfranc OE.**

Constructive hip surgery with the vitallium mould. A report of 1000 cases of arthroplasty of the hip over a fifteen year period.

J Bone Joint surg 1937; 39:237.

**Axhausen.**

Die histologischen und klinischen Gesetze der freien Osteoplastik.

Arch klein Chir 1908; 88:23.

**Baer WS.**

Arthroplasty with animal membrane.

Amer J surg 1918; 16:171.

**Barton JR.**

A new treatment in the case of ankylosis.

Amer J Med Sci 1838; 21:332.

**Barton JR.**

On the treatment of ankylosis by the formation of artificial joints.

N Amer surg 1827; J3:279.

**Baylink D, Farley J, Howard G.**

Coupling factor.

In: Massry SG, Letteri JM, Ritz E (eds): Regulation of phosphate and mineral metabolism. New York, Plenum Press 1982; p409.

**Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S.**

Growth factors to stimulate bone formation.

J Bone Miner Res. 1993 Dec;8 Suppl 2:S565-72. Review.

**Beck LS, Amento EP, Xu Y, Deguzman L, Lee WP, Nguyen T, Gillett NA.**

TGF-beta 1 induces bone closure of skull defects: temporal dynamics of bone formation in defects exposed to rhTGF-beta 1.

J Bone Miner Res. 1993 Jun;8(6):753-61.

**Bellido T, Jilka RL, Boyce BF, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, Murray R, Manolagas SC.**

Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor.

J Clin Invest. 1995 Jun;95(6):2886-95.

**Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR.**

Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors.

Nature. 1986 Feb 6-12;319(6053):516-8.

**Black J, Oppenheimer P, Morris DM, Peduto AM, Clark CC.**

Release of corrosion products by F-25 cobalt base alloy in the rat. III: Effects of a carbon surface coating.

J Biomed Mater Res 1987; 21:1213-1230.

**Black K, Garrett IR, Mundy GR.**

Chinese hamster ovarian cells transfected with the murine interleukin-6 gene cause hypercalcemia as well as cachexia, leucocytosis and thrombocytosis in tumor-bearing nude mice.

Endocrinology (1991) 128: 2657-2659.

**Bourque WT, Gross M, Hall BK.**

Expression of four growth factors during fracture repair.

Int J Dev Biol. 1993 Dec;37(4):573-9.

**Bowen RL.**

Compatibility of various materials with oral tissues. I: The components in composite restorations.

J Dent Res. 1979 May;58(5):1493-503.

**Brandis H, Pulverer G, Eggers HJ, Köhler W.**

Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie.

Fischer Verlag, Stuttgart, 7.Auflage (1994): 711-720.

**Brauner A, Kaden P.**

Die Zellkultur humaner Gingivafibroblasten zur biologischen Prüfung von in der Mundhöhle verwendeten Materialien.

Zeitschrift für Stomatologie (1989) 160: 323-335.

**Breen EC, Ignatz RA, McCabe L, Stein JL, Stein GS, Lian JB.**

TGF beta alters growth and differentiation related gene expression in proliferating osteoblasts in vitro, preventing development of the mature bone phenotype.

J Cell Physiol. 1994 Aug;160(2):323-35.

**Burger D, Chicheportiche R, Giri JG, Dayer JM.**

The inhibitory activity of human interleukin-1 receptor antagonist is enhanced by type II interleukin-1 soluble receptor and hindered by type I interleukin-1 soluble receptor.

J Clin Invest. 1995 Jul;96(1):38-41.

**Burger D, Dayer JM.**

Inhibitory cytokines and cytokine inhibitors.

Neurology. 1995 Jun;45(6 Suppl 6):S39-43. Review.

**Burkhardt R, Kettner G, Böhm W, Schmidmeier M, Schlag R, Frsich B, Mallmann B, Eisenmenger W, Gilg TH.**

Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis and old age: A comparative histomorphologic study.

Bone (1987) 8: 157-164.

**Canalis E.**

Effects of tumor necrosis factor on bone formation in vitro.

Endocrinology. 1987 Nov;121(5):1596-604.

**Canalis E.**

Insulin like growth factors and the local regulation of bone formation.

Bone. 1993 May-Jun;14(3):273-6.

**Canalis E.**

Interleukin-1 has independent effects on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in cultures of rat calvariae.

Endocrinology. 1986 Jan;118(1):74-81.

**Chambers TJ.**

Regulation of osteoclast development and function.

IN "Biology and Physiology of the Osteoclast" (BR Rifkin, CV Gay, eds.), (1992) pp. 105-128. CRC Press, Boca Raton.

**Chapchal G.**

Erfahrungen mit der Hüftgelenksarthroplastik mit Vitalliumkappe.

Z Orthop 1950; 79:417.

**Charnley J.**

Anchorage of femoral head prosthesis to the shaft of the femur.

J Bone Joint surg 1960; 42B:28.

**Chen TL, Bates RL.**

Recombinant human transforming growth factor beta 1 modulates bone remodeling in a mineralizing bone organ culture.

J Bone Miner Res. 1993 Apr;8(4):423-34.

**Cozzolino F, Torcia M, Aldinucci D, Rubartelli A, Miliani A, Shaw AR, Lansdorp PM, Diguglielmo R.**

Production of IL-1 by bone marrow myeloma cells.

Blood (1989) 74: 380-387.

**Dana-Street D, Zit. nach Gambier R.**

L Riccardie: Experimenti di artroplastica dell'anca con trapianto articolare totale.

Clin Orthop 1956; 8:252.

**Davis S, Aldrich TH, Ip NY, Stahl N, Scherer S, Farruggella T, DiStefano PS, Curtis R, Panayotatos N, Gascan H, Chevalier S, Yancopoulos GD.**

Released form of CNTF receptor  $\alpha$  component as a soluble mediator of CNTF responses.

Science (1993b) 259: 1736-1739.



**Davis S, Aldrich TH, Stahl N, Pan L, Taga T, Kishimoto T, Ip NY, Yancopoulos GD.**

LIFR $\beta$  and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor.

Science (1993a) 260: 1805-1808.

**de la Mata J, Uy HL, Guise TA, Story B, Boyce BF, Mundy GR, Roodman GD.**

Interleukin-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by parathyroid hormone-related protein in vivo.

J Clin Invest. 1995 Jun;95(6):2846-52.

**Deutschländer M, Zit. nach MacAusland RW.**

Arthroplasty of the hip.

Sixième congrès de la société internationale de Chirurgie, London 1923, Vol.1, Reports.

Médicale et Scientifique. Brüssel 1924.

**Dewhirst FE, Stashenko PP, Mole JE, Tsurumachi T.**

Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1 beta.

J Immunol. 1985 Oct;135(4):2562-8.

**Dexter TM, Spooner E, Simmons P, Allen TD.**

Long-term marrow culture: An overview of techniques and experience.

In: Alan R. Liss, Inc. (Hrsg),

Long-term marrow culture.

Alan R. Liss, Inc., 57-96 (1984).

**Dinarelli CA.**

Blocking interleukin-1 in disease.

Blood Purif. 1993;11(2):118-27.

**Dinareello CA.**

Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism.

Blood (1991) 77: 1627-1652.

**Dinareello CA.**

Interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist.

Nutrition. 1995 Sep-Oct;11(5 Suppl):492-4.

**Dinareello CA.**

Modalities for reducing interleukin 1 activity in disease.

Trends Pharmacol Sci. 1993 May;14(5):155-9.

**Dranoff G, Crawford AD, Sadelain M, Ream B, Rashid A, Bronson RT, Dickersin GR, Bachurski CJ, Mark EL, Whitsett JA, Mulligan RC.**

Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis.

Science 264 (1994), 713-716.

**Feldman GM, Petricoin EF 3rd, David M, Larner AC, Finbloom DS.**

Cytokines that associate with the signal transducer gp130 activate the interferon-induced transcription factor p91 by tyrosine phosphorylation.

J Biol Chem. 1994 Apr 8;269(14):10747-52.

**Felix R, Elford PR, Stoerckle C, Cecchini M, Wetterwald A, Treschel U, Fleisch H, Stadler BM.**

Production of hemopoietic growth factors by bone tissue and bone cells in culture.

J Bone Miner Res (1988) 3: 27-36.

**Fiers W.**

Tumor necrosis factor.

In: "The natural immune system: Humoral factors! (E. Sim, ed), pp. 65-119.

Irl Press at Oxford University Press (1993), Oxford.

**Frisch B, Eventov I.**

Hematopoiesis in osteoporosis – Preliminary report comparing biopsies of the femoral neck and iliac crest.

Isr J Med Sci (1986) 22: 380-384.

**Frost HM.**

Dynamics and bone remodeling.

In: Frost HM (ed): Bone biodynamics. Boston, Little Brown 1963a; p 315.

**Gabbitas B, Pash J, Canalis E.**

Regulation of insulin-like growth factor-II synthesis in bone cell cultures by skeletal growth factors.

Endocrinology. 1994 Jul;135(1):284-9.

**Galante J, Rostaker W, Lueck R, May RD.**

Sintered fiber metal composites as a basis for attachment of implants in bone.

J Bone Joint Surg 1921; 53A.101.

**Galante J, Rostaker W.**

Fiber metal composites in the fixation of skeletal prosthesis.

J Biomed Mater Res 1973; 4:43-61.

**Garret IR, Durie BGM, Nedwin GE, Gillespie A, Bringman T, Sabatini M, Bertolini DR, Mundy GR.**

Production of lymphotoxin, a bone resorbing cytokine, by cultured human myeloma cells.

N Engl J Medicine (1987) 317: 526-532.

**Gartner S, Kaplan HS.**

Long-term culture of human bone marrow cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. (1980): 4756-4759.

**Gill-Alborova.**

Lymphocyte response to PMMA in loose total hip prostheses.

J. Bone and Joint surgery (Br) 1992 (74-B):825-830.

**Girdlestone GR.**

Acute pyogenic arthritis of the hip. Operation giving free access and effective drainage.

Lancet 1943; I:419.

**Gluck T.**

Die Invaginationsmethode der Osteo- und Arthroplastik.

Berl Klin Wschr 1890; 19:732.

**Gowen M, Wood DD, Ihrle EJ, McGuire MK, Russell RG.**

An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro.

Nature. 1983 Nov 24-30;306(5941):378-80.

**Griss P, Heimke G, Krempien B, Hartung HS, Ruja S, Lauterbach HS, Diehm TH.**

Experimental ceramic joint replacement.

In: Williams D(ed) Biocompatibility of Implant Materials. Sector Publishing Ltd.

London 1976 a; 70-79.

**Griss P, Silber R, Merkle B, Hackner K.**

Biochemistry induced tissue reactions after  $Al_2O_3$ -ceramic hip joint replacement: experimental and early clinical results.

J Biomed Mater Res Symposium 1976 b; 7:519-528.

**Gross AE, Lavoie MV, McDermott P, Marks P.**

The use of allograft bone in revision of total hip arthroplasty.

Clin Orthop 1985; 197:115.

**Gross AE, Silverstein EA, Falk J, Langer F.**

The allotransplantation of partial joints in the treatment of osteoarthritis of the knee.  
Clin Orthop 1975; 108:75.

**Hagenaars CE, Kawilarang-de Haas EWM, va der Kraan AAM, Spooncer E, Dexter TM, Nijweide PJ.**

Interleukin-3 dependent hematopoietic stem cell lines capable of osteoclasts formation in vitro.  
J Bone Min Surg 6 (1991): 947-954.

**Harris SE, Bonewald LF, Harris MA, Sabatini M, Dallas S, Feng JQ, Ghosh-Choudhury N, Wozney J, Mundy GR.**

Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts.  
J Bone Miner Res. 1994 Jun;9(6):855-63.

**Hattersley G, Kerby JA, Chambers TJ.**

Identification of osteoclast precursors in multilineage hemopoietic colonies.  
Endocrinology 128 (1991): 259-262.

**Hattersly G, Owens J, Flanagan AM, Chambers TJ.**

makrophage colony stimulating factor (M-CSF) is essential for osteoclast formation in vitro.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 177 (1991), 526-531.

**Hayashi, K., Matsuguchi, N., Uenoyama, K., Kanemaru, T., Sugioka, Y.**

Evaluation of metal implants coated with several types of ceramics as biomaterial.  
J. Biomed. Mat. Res., 23, 1247-1259 (1989).

**Haynes DR, Boyle SJ, Rogers SD, Howie DW, Vernon-Roberts B.**

Variation in cytokines induced by particles from different prosthetic materials.

Clin Orthop. 1998 Jul;(352):223-30.

**Haynes DR, Hay SJ, Rogers SD, Ohta S, Howie DW, Graves SE.**

Regulation of bone cells by particle-activated mononuclear phagocytes.

J Bone Joint Surg Br. 1997 Nov;79(6):988-94.

**Haynes DR, Rogers SD, Hay S, Percy MJ, Howie DW.**

The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles.

J Bone Joint Surg Am. 1993 Jun;75(6):825-34.

**Heath JC, Freeman MAR, Swanson SAV.**

Carcinogenic properties of wear particles from prostheses made in cobalt-chromium alloy.

Cancer 1971; pp 564-566.

**Hilton DJ, Hilton AA, Raicevic A, Rakar S, Harrison-Smith M, Gough NM, Begley CG, et al, Nicola NA, Willson TA.**

Cloning of a murine IL-11 receptor alpha-chain; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction.

EMBO J. 1994 Oct 17;13(20):4765-75.

**Hirano T, Iwasaki K.**

Bone marrow plays a role in bone metabolism: Histomorphometry of iliac bone in postmenopausal women.

Calcif Tissue Int (1992) 51: 348-351.

**Hocking WG, Golde DW.**

Long-term human bone marrow culture.

Blood (1980), 56: 118-124.

**Horowitz MC, Coleman DL, Flood PM, Kupper TS, Jilka RL.**

Parathyroid hormone and Lipopolysaccharide induce murine osteoblast-like cells to secrete a cytokine indistinguishable from granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

J Clin Invest (1989 b) 83: 149-157.

**Horowitz MC, Coleman DL, Ryaby JT, Einhorn TA.**

Osteotropic agents induce the differential secretion of granulocyte-macrophage colony stimulating factor by the osteoblast cell line MC3T3-E1.

J Bone Miner Res (1989 a) 6: 911-921.

**Horowitz MC, Philbrick WM, Jilka RL.**

IL-1 release from cultured calvaria cells is due to macrophages.

J Bone Miner Res (1989c) 4: 556.

**Horowitz SM, Gautsch TL, Frondoza CG, Riley L Jr.**

Macrophage exposure to polymethyl methacrylate leads to mediator release and injury.

J Orthop Res. 1991 May;9(3):406-13.

**Howie DM.**

Biological effects of cobalt chrome in cell and animal models.

Clin Orthop (1996) 23 (Suppl):217-232.

**Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T, et al.**

IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption.

J Immunol. 1990 Nov 15;145(10):3297-303.

**Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC.**

Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6.

Science. 1992 Jul 3;257(5066):88-91.

**Jiranek WA, Machado M, Jasty M, Jevsevar D, Wolfe HJ, Goldring SR, Goldberg MJ, Harris WH.**

Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. Analysis with immunohistochemical techniques and in situ hybridization.

J Bone Joint Surg Am. 1993 Jun;75(6):863-79.

**Johner R.**

Zur Knochenheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße.

Helv Chir Acta 1972; 39:409-412.

**Johnson HJ, Northup SJ, Seagraves PA, Garvin PJ, Wallin RF.**

Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro.

1. Comparative test system sensitivity.

J Biomed Mat Res (1983): 571-586.

**Johnson RA, Boyce BF, Mundy GR, Roodman GD.**

Tumors producing human tumor necrosis factor induced hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice.

Endocrinology. 1989 Mar;124(3):1424-7.

**Kalla P, Hintz-Obertreis P, Wilke A, Griss P, Seiler FR, Rude E, Krumwieg D.**

Bone marrow obtained during hip surgery: a novel source for studies of hemopoiesis in human long-term bone marrow culture (LTBMC).

Behring Inst Mitt. 1991 Dec;(90):93-8.

**Kalla P, Oster W, Seiler F, Rude E, Krummwieh D.**

Myelosuppressive Effects of cytosine Arbinoside (Ara-C) on Growth factor dependent Human long-term bone marrow Cultures (LTBMC).

J of Cell Clon (1992), 10: 54-62.



**Kawano M, Tanaka H, Ishikawa H, Nobuyoshi M, Iwato K, Asoku H, Tanabe O, Kuramoto A.**

Interleukin-1 accelerates autocrine growth of myeloma cells through Interleukin-6 in human myeloma.

Blood (1989) 73: 2145-2148.

**Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM.**

Grundlagen der Immunologie.

In: „Medizinische Mikrobiologie.“, 9. Ed (1998) 43-131.

**Keeting PE, Rifas L, Harris SA, Colvard DS, Spelsberg TC, Peck WA, Riggs BL.**

Evidence for interleukin-1 beta production by cultured normal human osteoblast-like cells.

J Bone Miner Res (1991) 6: 827-833.

**Kerby JA, Hattersly G, Collins DA, Chambers TJ.**

Derivation of osteoclasts from hematopoietic colony-forming cells in culture.

J Bone Miner. Res. 7 (1992), 353-362.

**Kishimoto T, Taga T, Akira S.**

Cytokine signal transduction.

Cell. 1994 Jan 28;76(2):253-62.

**Knapp W.**

Leucocyte typing IV.

Oxford University Press (1990).

**Knutsen R, Honda Y, Strong DD, Sampath TK, Baylink DJ, Mohan S.**

Regulation of insulin-like growth factor system components by osteogenic protein-1 in human bone cells.

Endocrinology. 1995 Mar;136(3):857-65.

**Kurihara N, Chenu C, Miller M, Civin C, Roodman GD.**

Identification of committed mononuclear precursors for osteoclast-like cells formed in long-term human marrow cultures.

Endocrinology 126 (1990): 2733-2741.

**Kurihara N, Suda T, Miura Y, Nakauchi H, Kodama H, Hiura K, Hakeda Y, Kumegawa M.**

Generation of osteoclasts from isolated hematopoietic progenitor cells.

Blood 74 (1989), 1295-1302.

**Kurihara N, Civin C, Roodman GD.**

Osteotropic factor responsiveness of highly purified populations of early and late precursors for human multinucleated cells expressing the osteoclast phenotype.

J Bone Miner Res. 1991 Mar;6(3):257-61.

**Lexer E.**

Die freien Transplantationen.

In: Neue deutsche Chirurgie, Enke, Stuttgart 1924.

**Lexer E.**

Die gesamte Wiederherstellungschirurgie.

Barth, Leipzig 1931.

**Lexer E.**

Gelenktransplantationen.

Med klein 1908; 4:815.

**Lexer E.**

Über freie Gelenktransplantationen.

Langenbecks Arch Chir 1911; 95:827.

**Lips P, van Ginkel FC, Netelenbos JC.**

Bone marrow and bone remodeling.

Bone (1985) 6: 343-344.

**Lorenzo JA, Sousa SL, Alander C, Raisz LG, Dinarello CA.**

Comparison of the bone-resorbing activity in the supernatants from phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood mononuclear cells with that of cytokines through the use of an antiserum to interleukin 1.

Endocrinology. 1987 Sep;121(3):1164-70.

**Matsuda T, Hirano T.**

Association of p72 tyrosine kinase with Stat factors and its activation by interleukin-3, interleukin-6, and granulocyte colony-stimulating factor.

Blood. 1994 Jun 15;83(12):3457-61.

**McCarthy TL, Centrella M, Canalis E.**

Constitutive synthesis of insulin-like growth factor-II by primary osteoblast-enriched cultures from fetal rat calvariae.

Endocrinology. 1992 Mar;130(3):1303-8.

**Metcalf D.**

The colony stimulating factors.

In: "The Hematopoietic Colony Stimulating Factors", (1984) pp. 55-96: Elsevier, Amsterdam.

**Meunier P, Aaron J, Edouard C, Vignon G.**

Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue.

Clin Orthop Rel Res (1971) 80: 147-154.

**Middleton J, Arnott N, Walsh S, Beresford J.**

Osteoblasts and osteoclasts in adult human osteophyte tissue express the mRNAs for insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor.

Bone. 1995 Mar;16(3):287-93.

**Moore AT, Bohlmann HR.**

Metal hip joint – A case report.

J Bone Joint surg 1943; 25:688.

**Moore AT.**

Metal hip joint. A new selflocking vitallium prosthesis.

Sth Med J 1952 (Begham, Ala); 45:11.

**Moore AT.**

The selflocking metal hip prosthesis.

J Bone Joint surg 1957; 39A:811.

**Mundy GR, Luben RA, Raisz LG, Oppenheim JJ, Buell DN.**

Bone-resorbing activity in supernatants from lymphoid cell lines.

N Engl J Med (1974a) 290: 867-871.

**Mundy GR, Raisz LG, Cooper RA, Schechter GP, Salmon SE.**

Evidence for the secretion of an osteoclast stimulating factor in myeloma.

N Engl J Med (1974b) 291: 1041-1046.

**Murray PM, Wood MB.**

The results of treatment of synovitis of the wrist induced by particles of silicone debris.

J Bone Joint Surg Am. 1998 Mar;80(3):397-406.

**Nishinakamura R, Nakayama N, Hirabayashi Y, Inoue T, Aud D, McNeil T, Azuma S, Yoshida S, Toyoda Y, Arai KI, Miyajima A, Murray R.**

Mice deficient for the IL-3/GM-CSGF/IL-5  $\beta$ c receptor exhibit lung pathology and impaired immune response, while  $\beta$ IL-3 receptor-deficient mice are normal. Immunity (1995) 2: 211-222.

**Okazaki R, Conover CA, Harris SA, Spelsberg TC, Riggs BL.**

Normal human osteoblast-like cells consistently express genes for insulin-like growth factors I and II but transformed human osteoblast cell lines do not. J Bone Miner Res. 1995 May;10(5):788-95.

**Okazaki R, Durham SK, Riggs BL, Conover CA.**

Transforming growth factor-beta and forskolin increase all classes of insulin-like growth factor-I transcripts in normal human osteoblast-like cells. Biochem Biophys Res Commun. 1995 Feb 27;207(3):963-70.

**Orth J., Kautzmann J., Griss P.**

Bone tissue response to porous hydroxyapatite and wire meshes of stainless steel with and without coatings of hydroxyapatite and titaniumnitrite. Clinical Implant Materials, Advances in Biomaterials, 9, G. Heimke, U. Soltesz, A.J.C. Lee, Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam, 283-287 (1990).

**Orth J., Stenmans G., Kienapfel H.**

Bone remodelling during the first year after cementless THA with a proximally porous-coated composite stem and a Ti6AL4V stem. Trans. EORS, 1, 28 (1991).

**Osborn JF.**

[Biomaterials and their application to implantation].

SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd. 1979 Nov;89(11):1138-9. German.

**Owen M.**

Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system.

In "Bone and Mineral Research" (Peck WA, ed.), Vol 3. (1985) pp 1-24: Elsevier, Amsterdam.

**Park JB.**

Metallic Biomaterials.

In: Biomaterials, The Biomedical Engineering Handbook.  
CRC Press, 537-551 (1994).

**Peter A, Pichler WJ.**

Zytokine.

In: Klinische Immunologie, 2. Auflage, Urban Schwarzenberg Verlag (1996): 35-51.

**Pfeilschifter J, Chenu C, Bird A, Mundy GR, Roodman GD.**

Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclast-like cells in vitro.

J Bone Miner Res (1989) 4: 113-118.

**Pirskanen A, Jaaskelainen T, Maenpaa PH.**

Effects of transforming growth factor beta 1 on the regulation of osteocalcin synthesis in human MG-63 osteosarcoma cells.

J Bone Miner Res. 1994 Oct;9(10):1635-42.

**Pommer G.**

Über Osteoporose, ihren Ursprung und ihre differentialdiagnostische Bedeutung.  
Langenbecks Arch Klein Chir (1925) 136: 1-68.

**Raab-Cullen DM, Thiede MA, Petersen DN, Kimmel DB, Recker RR.**

Mechanical loading stimulates rapid changes in periosteal gene expression.  
Calcif Tissue Int. 1994 Dec;55(6):473-8.

**Rader CP, Baumann B, Rolf O, Schütze N, Jakob F, Eulert J.**

TNF-alpha Ausschüttung durch Abriebpartikel im humanen Makrophagenmodell und deren Beeinflussung durch Medikamente.

Osteologie 2000 Supplement 1/Band 9 (63).

**Rae T.**

A study of effects of particulate metals of orthopedic interest on murine macrophages in vitro.

J Bone and Jt Surg (1975): 444-450.

**Rappaport H, Lilly G, Kapsimalis P.**

Toxicity of endodontic filling materials.

Oral surgery, Oral Medicine and Oral Pathology (1964) 31: 785-802.

**Rasko JE, Gough NM.**

Granulocyte-macrophage colony stimulating factor.

In: "The Cytokine Handbook" (AW Thomson, ed.), (1994) Ed.2, pp. 343-369.

Academic Press, London.

**Rogers SD, Haynes DR.**

In vitro human monocyte response to wear particles of titanium alloy containing vanadium or niobium.

J Bone Joint Surg Br 1997 Mar;79(2):311-5.

**Roodman GD, Kurihara N, Ohsaki Y, Kukita A, Hosking D, Demulder A, Smith JF, Singer FR.**

Interleukin 6. A potential autocrine/paracrine factor in Paget's disease of bone.

J Clin Invest. 1992 a) Jan;89(1):46-52.

**Roodman GD.**

Interleukin-6: an osteotropic factor?

J Bone Miner Res. 1992 b) May;7(5):475-8.

**Roodman GD.**

Role of cytokines in the regulation of bone resorption.

Calcif Tissue Int. 1993;53 Suppl 1:S94-8.

**Rosen CJ, Donahue LR, Hunter SJ.**

Insulin-like growth factors and bone: the osteoporosis connection.

Proc Soc Exp Biol Med. 1994 Jun;206(2):83-102.

**Schmalzried TP, Campbell P, Schmitt AK, Brown IC, Amstutz HC.**

Shapes and dimensional characteristics of polyethylene wear particles generated in vivo by total knee replacements compared to total hip replacements.

J Biomed Mater Res. 1997 Fall;38(3):203-10.

**Schrader JW.**

Interleukin-3.

In: „The Cytokine Handbook“ (AW Thomson, ed.), (1994) Ed.2, pp. 81-98. Academic Press, London.

**Sehgal PB, Wang L, Rayanade R, Pan H, Margulies L.**

Interleukin-6-type cytokines.

Ann N Y Acad Sci. 1995 Jul 21;762:1-14.

**Semlitsch M.**

Metallische Werkstoffe für Implantate.

In: H. Rettig (Hrsg).

Biomaterialien und Nahtmaterialien.

Springer Verlag (1984): 107-111.

**Sheehan KC, Pinckard JK, Arthur CD, Dehner LP, Goeddel DV, Schreiber RD.**

Monoclonal antibodies specific for murine p55 and p75 tumor necrosis factor receptors: identification of a novel in vivo role for p75.

J Exp Med. 1995 Feb 1;181(2):607-17.



**Shinar DM, Endo N, Halperin D, Rodan GA, Weinreb M.**

Differential expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II messenger ribonucleic acid in growing rat bone.

Endocrinology. 1993 Mar;132(3):1158-67.

**Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K, et al.**

Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jul 1;90(13):6155-9.

**Simon JP.**

An overview of implant materials.

Acta Orthop. Belg. 1991; 57(1):1-5.

**Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS.**

Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man.

N Engl J Med. 1994 Oct 20;331(16):1056-61.

**Smith L.**

Ceramic plastic material as a bone substitute.

Arch surg 1963; 87-173.

**Smith-Petersen MN.**

Arthroplasty of the hip. A new method.

J Bone Joint Surg 1939; 21:169.

**Smith-Petersen MN.**

Evolution of the mould arthroplasty of the hip joint.

J Bone Joint surg 1948; 30B:59.

**Streicher RM, Schön R, Semlitsch MF.**

Untersuchungen des tribologischen Verhaltens von Metall-Metall-Kombinationen für künstliche Hüftgelenke.

Biomed. Tech., 35 (1990), 107-111.

**Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N.**

Modulation of osteoclast differentiation by local factors.

Bone (1995) 17 (Suppl.): 87s-91s.

**Süry, P.**

Untersuchungen zum Korrosionsverhalten gegossener und geschmiedeter Implantatwerkstoffe.

Werkstoffe und Korrosion, 26 (4), 278-287 (1975).

**Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T.**

Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130.

Cell. 1989 Aug 11;58(3):573-81.

**Thomson BM, Mundy GR, Chambers TJ.**

Tumor necrosis factor alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption.

J Immunol (1987) 138: 775-779.

**Trindade MC, Lind M, Goodman SB, Maloney WJ, Schurman DJ, Smith RL.**

Interferon-gamma exacerbates polymethylmethacrylate particle-induced interleukin-6 release by human monocyte/macrophages in vitro.

J Biomed Mater Res 1999 Oct;47(1):1-7.

**Vaes G.**

Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts.

Clin Orthop. 1988 Jun;(231):239-71.

**Valentin B.**

Geschichte der Orthopädie.

Thieme Stuttgart 1961.

**Valls J.**

A new prosthesis for arthroplasty of the hip.

J Bone Joint surg 1952; 34B:308.

**Vandenabeele P, Declercq W, Vanhaesebroeck B, Grooten J, Fiers W.**

Both TNF receptors are required for TNF-mediated induction of apoptosis in PC60 cells.

J Immunol. 1995 Mar 15;154(6):2904-13.

**Vernon-Roberts B, Freeman MAR.**

The tissue response to total joint replacement prostheses.

In Swanson SAV, Freeman MAR (eds). The scientific basis of joint replacement.

Turnbridge Wells, Kent, United Kingdom, Pitman medical publishing 1977: 86-129.

**Wang E, Wang J, Chin E, Zhou J, Bondy CA.**

Cellular patterns of insulin-like growth factor system gene expression in murine chondrogenesis and osteogenesis.

Endocrinology. 1995 Jun;136(6):2741-51.

**Wang JY.**

Inhibition of T and B cell proliferation by titanium, cobalt, and chromium: role of IL-2 and IL-6.

J Biomed Mater Res. 1996 ;32(4):655-61.

**Westerlind KC, Turner RT.**

The skeletal effects of spaceflight in growing rats: tissue-specific alterations in mRNA levels for TGF-beta.

J Bone Miner Res. 1995 Jun;10(6):843-8.

**Wilke A, Endres S, Stürz S, Wessel C, Griss P, Jones D.**

Zytokinprofil einer humanen Knochenmarkzellkultur unter Exposition von Chrom-Cobalt-Partikeln.

Zeitschrift für Osteologie 2000.

**Wilke A, Landgraff M, Orth J, Poenitz H, Kienapfel H, Boelte K, Griss P, Franke RP.**

Human bone marrow cell culture: A sensitive method for determination of the biocompatibility of implant materials.

ATLA 1999; (27):137-151.

**Wilke A, Orth J, Griss P, Nehls V, Drenckhahn D.**

Development of a human bone marrow cell culture to test the cytocompatibility of bulk hydroxyapatite materials.

In: Ravaglioli A, Krajewski A (Hrsg).

Bioceramics and the human body.

Elsevier Applied Science (1991): 471-476.

**Wilke A, Orth J, Griss P.**

Development of a human bone marrow cell culture to test the cytocompatibility of bulk hydroxyapatite materials.

Proceeding of the Int. Congress on Bioceramics and the human body held in Faenza, Italy April 1991.

**Wilke A, Orth J, Kienapfel H, Schröder G, Griss P.**

Sensitivity of a human bone marrow cell culture to test the biocompatibility of different biomaterials.

Trans., 4<sup>th</sup> World Biomaterial Congress, April (1992), Berlin, (162).

**Wilke A, Orth J, Lomb M, Fuhrmann R, Kienapfel H, Griss P, Franke RP.**

Biocompatibility analysis of different biomaterials in human bone marrow cell cultures.

J Biomed Mater Res. 1998 May;40(2):301-6.

**Wilke A, Schroder G, Orth J, Griss P, Franke RP.**

[Evaluation of the biocompatibility of implant materials with human bone marrow cell cultures].

Biomed Tech (Berl). 1993 Jun;38(6):126-9. German.

**Wilke A, von Hirschheydt S, Orth J, Kienapfel H, Griss P, Franke RP.**

[Human bone marrow cell culture--a sensitive method for the evaluation of the biocompatibility of materials used in orthopedics].

Z Orthop Ihre Grenzgeb. 1995 Mar-Apr;133(2):159-65.

**Willert HG, Semlitsch M, Buchhorn G, Kriete U.**

Materialverschleiß und Gewebereaktion bei künstlichen Gelenken.

Der Orthopäde 7 (1978), 62-67.

**Willert HG, Buchhorn G, Semlitsch M.**

Die Reaktion des Gewebes auf Verschleißprodukte von Gelenkendoprothesen der oberen Extremität.

Orthopädie 1980a; 94-107.

**Willert HG, Semlitsch M.**

Reactions of the articular capsule to wear products of artificial jprotheses.

J Biomed Mater Res 1977; 11:157-164.

**Willert HG, Buchhorn U.**

Proposed guideline for the biological testing of orthopedic implant materials and implants.

Biomaterials 1980b; 1:182.197.

**Williams DF.**

Biomaterials and biocompatibility.

Med. Prog. Technol. 1976 (Juli); 4(1-2):31-42.

**Yamaguchi A.**

Regulation of differentiation pathway of skeletal mesenchymal cells in cell lines by transforming growth factor-beta superfamily.

Semin Cell Biol. 1995 Jun;6(3):165-73. Review.

**Zheng MH, Wood DJ, Papadimitriou JM.**

What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation?

Pathol Res Pract. 1992 Dec;188(8):1104-21. Review.

**Zhou H, Hammonds RG Jr, Findlay DM, Martin TJ, Ng KW.**

Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and bone morphogenetic protein 4 on gene expression and differentiated function of preosteoblasts.

J Cell Physiol. 1993 Apr;155(1):112-9.

# *Verzeichnis akademischer Lehrer*

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg:

Arnold	Grzeschik	Lengsfeld	Schulz
Aumüller	Gudermann	Löffler	Sedlacek
Barth	Happle	Lorenz	Seifart
Bartsch	Hasilik	Maisch	Seitz
Basler	Hasse	Mennel	Seyberth
Baum	Hebebrand	Moll	Simon
Berger	Hellinger	Moosdorf	Sommer
Bertalanffy	Hellwig	Mueller	Steiniger
Beyer	Herzum	Müller	Stief
Bien	Hesse	Neubauer	Stinner
Brilla	Höffken	Nies	Storck
Christiansen	Hofmann	Oertel	Sturm
Czubayko	Jones	Pfab	Suske
Daut	Joseph	Pfeiffer	Vogelmeier
Dobbelstein	Kaiser	Radsak	Vogt
Effendy	Kaluza	Remschmidt	Vohland
Eissele	Katschinski	Renz	Voigt
Elsässer	Kern	Richter	Wagner
Fischer	Kienapfel	Röhm	Wagner
Fruhstorfer	Klose	Rogausch	Weihe
Fruhstorfer	Köhler	Roth-	Werner
Gemsa	Koolmann	Dobbelstein	Westphal
Geus	Kretschmer	Rothmund	Wichert von
Görg	Krieg	Schäfer	Wilke
Gotzen	Kuhn	Schäfer	Wirth
Grau	Lammel	Schlenzka	Wolf
Grimm	Lang	Schneider	Zelder
Griss	Lange	Schüffel	Zielke

# *Danksagung*

Diese vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1998 bis Dezember 2001 im Labor für experimentelle Orthopädie der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Bedanken möchte ich mich zuerst bei dem besten Doktorvater, PD. Dr. Dr. Axel Wilke, den man sich für solch eine Arbeit nur vorstellen kann. Seine ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung sowohl in bezug auf diese Arbeit als auch bei anderen Problemen ließen mich mit Freude diese Arbeit anfertigen.

Weiterer Dank gilt auch dem Labor für experimentelle Orthopädie mit seinem Direktor Prof. Dr. David Jones, der durch sein Wissen und seine Kollegialität mir für diese Arbeit Denkanstöße, konstruktive Kritik und Unterstützung zukommen ließ.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Marita Kratz, MTA und Leiterin des Labor für experimentelle Orthopädie, bedanken. Ohne sie wäre es nie möglich gewesen, diese Arbeit so wie sie jetzt ist zu beenden.

Ein großes Danke schön gebührt meiner Freundin, Nadine, die beim Anfertigen dieser Arbeit und auch ansonsten im Studium immer für mich da war.

Besonderer Dank gebührt meinen Eltern für die Unterstützung während meines Studiums in allen Bereichen.

Schließlich möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit bei der Deutschen Arthrosehilfe bedanken.